

18/5/8

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

009177505

WPI Acc No: 1992-304940/199237

XRAM Acc No: C92-135798

Synthetic gene for prepn. of human serum albumin - comprises synthetic DNA contg. gene coding the albumin using coding in Escherichia coli

Patent Assignee: AJINOMOTO KK (AJIN )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 4211375	A	19920803	JP 9114600	A	19910205	199237 B

Priority Applications (No Type Date): JP 9025682 A 19900205

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 4211375	A	37		C12N-015/14	

Abstract (Basic): JP 4211375 A

A synthetic DNA contg. a gene coding human serum albumin (I) designed by frequently using codons used frequently in E coli, pref. having a specified restriction enzyme map, is new. A plasmid contg. the above synthetic DNA, a microbe transformed by the plasmid, and the prepn. of (I) in which the microbe is cultured in medium and (I) is isolated from the microbe body or the culture, are claimed.

USE/ADVANTAGE - (I) productivity in E coli is enhanced

Dwg.0/0

Title Terms: SYNTHETIC; GENE; PREPARATION; HUMAN; SERUM; ALBUMIN; COMPRISE; SYNTHETIC; DNA; CONTAIN; GENE; CODE; ALBUMIN; CODE; ESCHERICHIA; COLI

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/14

International Patent Class (Additional): C12N-001/21; C12P-021/02; C12R-001-19; C12R-001-125; C12R-001-08

File Segment: CPI

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-211375

(43)公開日 平成4年(1992)8月3日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 15/14 1/21	ZNA	7236-4B		
C 12 P 21/02	C	8214-4B		
// (C 12 N 1/21)		8828-4B	C 12 N 15/00	A
			審査請求 未請求 請求項の数9(全37頁)	最終頁に統く

(21)出願番号	特願平3-14600	(71)出願人	000000066 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目15番1号
(22)出願日	平成3年(1991)2月5日	(72)発明者	橋口 貢一 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号味の 素株式会社中央研究所内
(31)優先権主張番号	特願平2-25682	(72)発明者	児島 宏之 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号味の 素株式会社中央研究所内
(32)優先日	平2(1990)2月5日	(72)発明者	山田 和彦 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号味の 素株式会社中央研究所内
(33)優先権主張国	日本 (JP)	(74)代理人	弁理士 湯浅 茂三 (外4名)

(54)【発明の名称】 合成遺伝子及びそれを用いたヒト血清アルブミンの製造法

## (57)【要約】

【構成】大腸菌で多用されるコドンを頻用して設計した、ヒト血清アルブミン蛋白をコードする遺伝子を含む合成DNAを構築する。この合成DNAをプラスミドに組み込み、微生物に導入して該微生物を形質転換する。最後に、この形質転換体を培地中で培養し、その菌体内または培地中からヒト血清アルブミンを単離する。

【効果】大腸菌等においてヒト血清アルブミン生産量を飛躍的に増加させることができる。

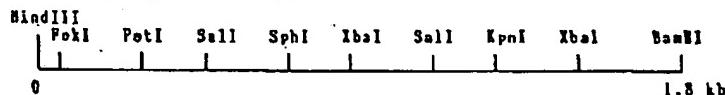
1

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 大腸菌で多用されるコドンを頻用して設計した、ヒト血清アルブミン蛋白をコードする遺伝子を含む合成DNA。

【請求項2】 合成DNAがヒト血清アルブミン蛋白の\*



【請求項4】 合成DNAが配列表の配列番号1で示される配列を有するものである請求項1記載の合成DNA。

【請求項5】 合成DNAが配列表の配列番号2で示される配列を有するものである請求項1記載の合成DNA。

【請求項6】 請求項1ないし5記載の合成DNAを含有するプラスミド。

【請求項7】 請求項6記載のプラスミドで形質転換された微生物。

【請求項8】 微生物がエシエリシア・コリ (E. coli)、バチルス・サチルス (B. subtilis) またはバチルス・ブレビス (B. brevis) である請求項7記載の微生物。

【請求項9】 請求項7または8記載の微生物を培地中で培養し、その微生物菌体または培地中からヒト血清アルブミンを単離することを特徴とするヒト血清アルブミンの製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はヒト血清アルブミン (HSA) をコードする遺伝子を含む合成DNA、合成DNAを有するプラスミド、該プラスミドにより形質転換された微生物及び該微生物を培養してヒト血清アルブミンを製造する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 組換えDNA技術の進歩によって、大腸菌等の微生物において高等真核生物由来の遺伝子を発現させ、その目的遺伝子産物を微生物を培養することによって取得する技術が発展してきた。一般に高等真核生物の遺伝子は、mRNAを調製して、逆転写酵素によって作製したcDNAからクローニングすることによって得られている。ヒト血清アルブミンについても、例えば特開昭58-56684等にcDNAの調製法が開示されている。

【0003】 蛋白質をコードする遺伝子はその蛋白質のアミノ酸配列を1アミノ酸につきDNAの3塩基からなる遺伝暗号 (コドン) によってコードしているが、あるアミノ酸に対応する遺伝暗号は必ずしも1つではない。そして、大量に発現している遺伝子では生物種によって使用されている遺伝暗号に偏りがみられることが知られ

\* N末端付近をコードする領域に单一の制限酵素切断部位を保持することを特徴とする請求項1記載の合成DNA。

【請求項3】 合成DNAが下記に示す制限酵素地図を有するものである請求項1記載の合成DNA。

10 ている。

【0004】 従って、前記の方法で調製されたcDNAからなる遺伝子は高等真核生物において多用される遺伝暗号からなる遺伝子であり、必ずしも大腸菌等の原核生物である微生物における発現に好適なものではない。

【0005】 また、遺伝子を発現させるには適当な発現制御系に接続する必要があり、より好適な発現制御系に接続することによって同じ遺伝子の発現効率を飛躍的に高めることが出来ることが知られている。遺伝子をより好適な発現制御系に接続するためには、遺伝子中に存在する制限酵素部位等が適切に配置されていることが操作上望ましく、特にコードする蛋白質のN末端付近の領域に单一の制限酵素部位が存在することが望ましい。しかしながら、cDNAにおいては遺伝子中に存在する制限酵素部位は全くランダムと言ってよく、操作上好適な配置をとっている場合は極めて希である。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】 上述の如く、高等真核生物由来の蛋白質を原核生物である微生物を培養することによって工業的に有利に生産するためには、目的遺伝子をより好適な発現制御系に接続することとともに、遺伝子本体もまた宿主たる原核生物である微生物においてより効率よく発現するDNA配列を持ったものであることが望まれる。また、より好適な発現系に接続するにあたっての便宜上、適当な制限酵素部位が、適切に配置されていることが望まれる。本発明の目的は、cDNAを用いて高等真核生物由来の蛋白質を原核生物である微生物に生産せしめる方法の不完全さを是正し、より効率的な遺伝子発現、蛋白質生産を行なうための技術を提供することにある。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、高等真核生物であるヒト由来の蛋白質であるヒト血清アルブミンを大腸菌等の原核生物である微生物においてより効率的に生産するために、ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列をコードするDNA配列を、

①アミノ酸配列を変化させない。

②操作上有用と思われる制限酵素部位を残し、不用な制限酵素部位を除く。

③目的蛋白質のN末端をコードする領域に单一の有用な制限酵素部位を設ける。

- ④安定な2次構造を取らないようにする。  
⑤大腸菌で多用されている遺伝暗号（コドン）を用いる。

について考慮しながら設計し、化学合成したDNAのオリゴマーから実際にヒト血清アルブミンを大腸菌等の原核生物である微生物において著量生産させ得る合成DNAを構築するとともに、この合成DNAを含有するプラスミドで形質転換された微生物を培地中で培養することにより目的のヒト血清アルブミンを生産することができ、本発明を完成するに至った。

【0008】さて、cDNAを用いて大腸菌（E. coli）、枯草菌（B. subtillis）等の微生物でヒト血清アルブミンを生成する方法は、特開昭58-56684、特開昭58-150517、特開昭61-275229、特開昭62-215393などに開示されている。しかしこれらは遺伝暗号（コドン）の選択の余地の無いcDNAの持つ性格の故に、その発現効率、従って生産量には自ずと限界があるものである。大腸菌等においてのヒト血清アルブミン生産量の飛躍的な増加は、本発明によって初めて可能となった。また、特開昭62-29985には特定のアミノ酸配列から類推されるDNA配列一般が開示されているが、本発明のアミノ酸配列は特開昭62-29985に開示されているアミノ酸配列とは多くの相違点がある。

【0009】本発明者らは原核生物に適したコドンに注目して、ヒト血清アルブミンをコードするDNAをデザインして化学合成した。

【0010】なお、オリゴヌクレオチドの合成にはトリエスチル法（Nuc. Acid. Res. 10, 6553 (1982)）や、ホスホアミダイト法（Tetrahedron Letters 22, 1859 (1981)）等の方法がすでに開発されており、いずれの方法を用いてもよい。

【0011】また、近年、合成に必要なヌクレオチドや試薬のキット更には自動合成機器も市販されているので、当然これらを用いてもよい。

【0012】次にこの合成DNAを宿主に導入し、増殖、発現させるために適当なプラスミドに組み込む。

【0013】本発明において用いられるプラスミドは特に限定されないが大腸菌を宿主とする場合は通常よく利用されるpSC101, pBR322, pUC19, pUC18, pHSG298, pHSG299, pHSG398, pHSG399等を用いればよい。

【0014】また枯草菌を宿主とする場合には、pUB110, pC194, pE194等を用いればよい。

【0015】バチルス・ブレビスを宿主とする場合は、pHY500, pNU200 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3589 (1989)) 等を用いればよい。もちろん、繰り返し述べるが、本発明は上記プラスミドベクターに限定されるもの

ではない。

【0016】次に、このようにして得た組み換えDNAで宿主を形質転換るのである。形質転換法として①細胞を塩化カルシウム、塩化ルビジウム、または磷酸カルシウムで処理する方法（塩化カルシウム、塩化ルビジウム、または磷酸カルシウム法）、②電気パルスによる方法（エレクトロボーレーション法）、③プロトプラストを利用する方法（プロトプラスト法）等の方法があるが、いずれの方法を用いてもよい。またその他の方法を用いてもよい。最後にこの形質転換体を培地中で培養して菌体内に生産もしくは培地中に分泌させ、それを精製するのであるが、このプロセスは通常用いられる以下の方法に従えばよい。

【0017】培地は適当な炭素源、窒素源、無機塩類、使用菌株が特に要求する物質を含んだものを用いればよい。培養時間は使用菌株によって多少異なり特に限定されないが、通常5時間から100時間程度でよい。

【0018】生成物の取り上げ方法は、菌体内に顆粒状に生産させた場合は、集菌後菌体をリソチーム、超音波等で処理して破碎し、低速遠心によって顆粒を沈殿、採取し、尿素や塩酸グアニジン等で処理して可溶化する。それを希釈や透析等によって巻き戻しを行い、通常よく用いられるHPLC法等によって精製すればよい。培地中に分泌生産した場合は、菌体を除去後、培地から通常よく用いられるHPLC法等によって精製すればよい。

【0019】以下、本発明を実施例に従って具体的に説明する。

#### 【0020】

##### 【実施例1】

###### 30 [全合成ヒト血清アルブミン遺伝子の構築]

###### 遺伝子の設計

現在の合成DNA技術と、本発明者らの採用している精製法では安定して得られるDNA鎖は最大70塩基程度である。ヒト血清アルブミンは585アミノ酸であるので1755塩基の遺伝子が少なくとも必要であり、少なくとも25本程度に分割して合成する必要がある。また2本鎖としてプラスミドに組み込む必要があるので、その2倍のDNAを合成する必要がある。またプラスミドに組み込んだ時点で塩基配列の確認が必要なので確実に塩基配列が確認できる長さに分けてプラスミドに組み込む方が操作上都合がよい。従って全体を一度に組み立てるのではなく、8つ程度の部分に分けてフラグメントの集合を行い、そこで塩基配列の確認を行ってから全体を構築することにした。

###### 【0021】以上の前提条件をもとに、

- ①ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列を変化させない。
- ②集合させる時に用いる制限酵素の認識部位を必要なだけ持たせる。

###### 【0022】(不必要的認識部位を除く。)

- ③N末端のなるべく近くに遺伝子内で単一の制限酵素部

位を1つ持たせる。(様々な発現システムへ容易に遺伝子を接続することを可能にする。)

④安定な2次構造を取らないようにする。

⑤大腸菌で汎用されている遺伝子暗号をなるべく用いる。

の順番に条件を考慮しながら遺伝子の設計を行った。ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列は複数の文献によって開示されているが、それらは互いに少しずつの相違がある(FEBS LETTERS 58, 134, (1975), Nucleic Acids Research 9, 6103, (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 71, (1982), J. Biol. Chem. 261, 6747, (1986)).

【0023】本発明者らは、一般にDNAの配列を求める方がアミノ酸の配列を求めるよりも信頼性が高いと考えられること、報告されている年次が新しいことの2つの理由により、アミノ酸配列そのものを決定した文献ではなく、mRNAより作製したcDNAの塩基配列を決定することによってアミノ酸配列を報告している比較的新しい文献、即ち、Nucleic Acids Research 9, 6103 (1981) 及びProc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 7

1. (1982)を主に参考にした。

【0024】しかし、上述の2つの文献に示されたcDNAから類推されるアミノ酸配列にも2ヶ所の相違点がある。すなわち1つは胎児の肝臓から取ったmRNAから類推したもの(Nucleic Acids Research 9, 6103 (1981))、もう1つは成人の肝臓から取ったmRNAから類推したもの(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 71, (1982))である。

【0025】本発明者らは実用性を考えて成人の配列を採用した。コンピュータを用いてアミノ酸配列から取り得る制限酵素部位を検索し、それをもとにして大腸菌で汎用されているコドンを選びながら制限酵素部位の取捨選択を行い、DNA配列の最初の候補を作成した。

【0026】その候補配列をコンピュータの高次構造検索プログラムに入力し、著しい二次構造を検索し、取り除いた。最終的に決定した遺伝子の塩基配列を図1に示した。

【0027】この設計した遺伝子でのコドンの使用割合を以下に示した。

【0028】

【表1】

7

TTT-Phe 1(0.17%)	<u>TCT-Ser</u> 15(2.56%)
TAT-Tyr 0(0.00%)	<u>TGT-Cys</u> 0(0.00%)
<u>TTC-Phe</u> 30(5.13%)	<u>TCC-Ser</u> 8(1.37%)
<u>TAC-Tyr</u> 18(3.08%)	<u>TGG-Cys</u> 35(5.98%)
TTA-Leu 0(0.00%)	TCA-Ser 1(0.17%)
TAA-*** 0(0.00%)	TGA-*** 0(0.00%)
TTC-Leu 0(0.00%)	TCG-Ser 0(0.00%)
TAG-*** 0(0.00%)	<u>TGG-Ile</u> 1(0.17%)
CTT-Leu 3(0.51%)	CCT-Pro 0(0.00%)
<u>CAT-His</u> 0(0.00%)	<u>CGT-Ala</u> 13(2.22%)
CTC-Leu 1(0.17%)	CCC-Pro 0(0.00%)
<u>CAC-His</u> 8(2.74%)	<u>GGG-Ara</u> 10(1.71%)
CTA-Leu 3(0.51%)	CCA-Pro 1(0.17%)
CAA-Gln 1(0.17%)	CCA-Arg 1(0.17%)
<u>CTG-Leu</u> 54(9.73%)	<u>GGG-Pro</u> 23(3.93%)
<u>CAG-Gln</u> 9(3.25%)	GGG-Ara 0(0.00%)
ATT-Ile 0(0.00%)	<u>ACT-Thr</u> 7(1.20%)
AAT-His 0(0.00%)	<u>ACT-Ser</u> 0(0.00%)
ATC-Ile 8(1.37%)	<u>ACC-Thr</u> 21(3.59%)
<u>AAC-Asn</u> 17(2.91%)	ACC-Ser 0(0.00%)
ATA-Ile 0(0.00%)	ACA-Thr 0(0.00%)
<u>AAA-Lys</u> 58(9.91%)	ACA-Arg 0(0.00%)
ATG-Met 8(1.03%)	ACG-Thr 0(0.00%)
AAC-Lys 2(0.34%)	ACG-Ara 0(0.00%)
<u>CTT-Val</u> 7(3.91%)	<u>CGT-Ala</u> 22(3.76%)
CAT-Asp 1(0.17%)	<u>GGT-Gly</u> 9(1.54%)
GTC-Val 1(0.17%)	GGC-Ala 0(0.00%)
<u>GAC-Asp</u> 35(5.98%)	<u>GGC-Gly</u> 3(0.51%)
TTA-Val 13(2.22%)	<u>GGA-Ala</u> 22(3.76%)
<u>GAA-Glu</u> 57(9.74%)	GGG-Gly 0(0.00%)
<u>GTG-Yello</u> 1(1.71%)	<u>GGG-Ala</u> 18(3.08%)
GAAG-Gln 4(0.68%)	GGG-Gly 0(0.00%)

【0029】下線を施した部分は、大腸菌で大量に発現するとされている遺伝子に広く用いられているコドン（メジャーコドン）と、一種類しかない、メチオニン、トリプトファン、それにコドンユーセージに片寄りが見られないシステインのコードである（参考文献：細胞工学，2，1541（1983））。上記のようにほとんどメジャーコドンを用いて遺伝子を設計することができ

8

た。アミノ酸配列のもとにした文献のヒト血清アルブミンをコードするエクソン部分のDNA配列について同じことを行なうと以下のようになり、大腸菌におけるメジャーコドンの使用頻度はむしろ低いことが判明した。

【0030】

【表2】

TTT-Phe21(3.58%)	TCT-Ser 3(0.51%)
TAT-Tyr12(2.05%)	TGT-Gly15(2.56%)
TTC-Phe10(1.71%)	TCC-Ser 5(0.85%)
TAC-Tyr 6(1.02%)	TGC-Cys20(3.41%)
TTA-Leu10(1.71%)	TCA-Ser 6(1.02%)
TAA--- 1(0.17%)	TGA--- 0(0.00%)
TTC-Leu12(2.05%)	TGG-Ser 2(0.34%)
TAG--- 0(0.00%)	TGG-Thr 1(0.17%)
CTT-Leu18(3.07%)	CCT-Pro10(1.71%)
CAT-His11(1.88%)	CGT-Ara 2(0.34%)
CTC-Leu 5(0.85%)	CCC-Pro 6(1.02%)
CAC-His 5(0.85%)	CGG-Ara 1(0.17%)
CTA-Leu 4(0.68%)	CCA-Pro 7(1.19%)
CAA-Glu10(1.71%)	CGA-Ara 2(0.34%)
CTG-Leu12(2.05%)	CCG-Pro 1(0.17%)
CAC-Glu10(1.71%)	CGG-Ara 2(0.34%)
ATT-Ile 3(0.51%)	ACT-Thr 7(1.19%)
ATT-Lys10(1.71%)	ACT-Ser 8(1.02%)
ATC-Ile 4(0.68%)	ACC-Thr 7(1.19%)
AAC-Asn 1(1.19%)	AGC-Ser 2(0.34%)
ATA-Ile 1(0.17%)	ACA-Thr12(2.05%)
AAA-Lys41(7.00%)	AGA-Arg13(2.22%)
ATG-His 5(1.02%)	ACG-Thr 2(0.34%)
AGG-Lys19(3.24%)	AGG-Arg 4(0.68%)
GTT-Val11(1.88%)	GCT-Ala29(4.95%)
GAT-Lys25(4.27%)	GCT-Gly 2(0.34%)
GTC-Val 7(1.19%)	GCG-Ala14(2.39%)
GAC-His11(1.88%)	GGC-Gly 3(0.51%)
GTA-Val 7(1.19%)	GCA-Ala17(2.90%)
GAA-Glu37(6.31%)	GGA-Gly 6(1.02%)
GTG-Val16(2.13%)	GCG-Ala 2(0.34%)
CAC-Gln24(4.10%)	GGG-Gly 1(0.17%)

【0031】さて、図1に示した配列において、最初にあるAAGCTTのHindIII部位は遺伝子構築の便宜上、付加したものである。またN末端近くにユニークな制限酵素部位を導入する目的で、認識部位と切断部位とが離れているFokIを図2のように導入して切り離すようにした。

【0032】FokIは認識部位の9塩基／13塩基（上側鎖／下側鎖）3'側を切断するので、認識部位を図2のようにアミノ酸配列の5'に隣接して置くことにより血清アルブミン遺伝子のN末端近くで切断できるようになる。ただしこのためには、遺伝子中のFokI認識配列を全て除いておく必要がある。

【0033】遺伝子全体の構築に用いる制限酵素はHindIII, KpnI, SalI, PstI, XbaI, SphI, BamHIとした。これらの酵素での切断点地図を図3に示した。

#### 【0034】DNAの化学合成

設計したDNA配列（図1）を図4のようにフラグメン

トに分割し、Applied Biosystems社のDNA合成機を用いて各々のフラグメントの両鎖をホスホアミダイト法（Tetrahedron Letters 22, 1859 (1981)）によりそれぞれ合成した。

#### 【0035】遺伝子の構築

合成したDNAの260nmの吸光度を測定して濃度を40決定した後に、1回の操作で約100ピコモルを用いた。図3, 4に示した制限酵素で8つのブロックにわけ、各ブロックを構成する各断片の両鎖をアニールし、T4リガーゼでライゲーションして各ブロックに相当する断片を生成させ、それらをpUC18もしくはpUC19にクローニングした。クローニングした各ブロックのDNA配列をジテオキシ法（Science, 214, 1205 (1981)）によって少なくとも2回にわたって確認した後、各ブロックの断片を調製した。次に各断片約1μgとpUC18またはpUC19約1μgを用50いてライゲーションを行い、ブロック1, 2, 3とブロ

11

ック4, 5と、ブロック6, 7, 8とをそれぞれ連結した中間的ブロックをpUC18またはpUC19にクローン化した。最後に3つの中間的ブロック約1μgとpUC19約1μgを用いてライゲーションを行い、全ブロックを連結した目的の遺伝子を含むプラスミドpHSAを構築した(図3)。

【0036】

## 【実施例2】

## 【全合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大腸菌での発現】

前出の方法と合成機を用いて図5に示すような合成DNAを作成した。なお、同図中、SDはリボソーム結合部位を表す。次にこの合成DNAと先ほど作成したプラスミドpHSA及びプラスミドpT13s(Nco)(J. Biochem., 104, 30 (1988))から図6に示すように発現プラスミドpSDHSA4を作成した。なお、プラスミドpT13s(Nco)は、工業技術院微生物工業研究所に寄託されている保持菌株AJ12447(FERM P-10757)から調製した。

【0037】この発現プラスミドpSDHSA4の調製の詳細は以下の通りである。即ち、pHSAをFok IとBamHIで切断し、最も大きな断片(合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大部分を含む約1.8kb断片)を調製する。一方、pT13s(Nco)をCla IとBamHIで切断し、大きい方の断片(trpプロモーター、ターミネーター、アンピシリン耐性遺伝子を含む約2.6kb断片)を調製する。この両者と図5に示した合成DNAとをT4リガーゼでライゲーションしてpSDHSA4を構築した。

【0038】このようにして得られたプラスミドpSDHSA4は、trpプロモーター-オペレーターの制御下、Met残基に成熟型HSAが直接連結した蛋白を発現するように設計されており、転写ターミネーターとしてtrpAターミネーターを備えている。

【0039】次にこの発現プラスミドpSDHSA4で通常よく用いられる塩化ルビジウム法を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、形質転換株HB101/pSDHSA4を得た。この株をグルコース、酵母エキス、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、MgSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、ビタミンB1を含む培地で培養した。培養開始後4時間でインドールアクリル酸による誘導をかけ、誘導後約15時間培養したところ、菌体内に顆粒が生成していた。

【0040】集菌後、20mM Tris-HCl 30mM NaCl 0.5M EDTAバッファーに懸濁し、0.25mg/mlリゾチームで0℃1時間処理後、超音波破碎した。顆粒を低速遠沈後、20mM Tris-HCl 30mM NaCl 0.5M EDTAバッファーにて洗浄、再び遠沈し、10mM EDTA溶液に懸濁し、顆粒画分とした。

【0041】図7(A)はHB101, HB101/p

12

SDHSA4の全菌体蛋白及び顆粒画分をSDSポリアクリルアミド電気泳動した図である。図中の1, 2, 3, Mの略号は以下の通りである。

- 【0042】1. HB101全菌体蛋白
- 2. HB101/pSDHSAE12全菌体蛋白
- 3. HB101/pSDHSAE12顆粒画分

## M. 分子量マーカー

HB101/pSDHSA4の菌体蛋白には、宿主のHB101には見られない分子量約67Kのバンドが認められ、それは、顆粒画分に回収されている。ヒト血清アルブミンの分子量は約67Kであり、予定された分子量の蛋白が顆粒として生成していることがわかった。

【0043】図7(A)と同様の電気泳動後(蛋白量は1/30)、抗HSA抗体でウェスタンプロットを行なうと図7(B)のようなパターンになり、顆粒状生成した蛋白は抗ヒト血清アルブミン抗体と反応することが示された。

【0044】顆粒を6M塩酸グアニジンで可溶化し、ジチオスレイトールを加えて(final 0.1M) 100°C 2分処理後、逆相HPLCで顆粒蛋白を精製した。これをアミノ酸シークエンサーにかけ、N末端付近のアミノ酸配列を調べたところ、図8のように、調べた16アミノ酸残基の全てが一致した。なお、同図中、Observedは実際に観察された配列を、Predictedは予定した配列をそれぞれ示す。

【0045】以上のことから、大腸菌においてN末端にMet残基の付加した形でヒト血清アルブミンを顆粒状に生成することができたことが示唆された。

【0046】形質転換株HB101/pSDHSA4 (AJ12498)は、工業技術院微生物工業研究所に寄託されている(FERM P-11208)。

【0047】顆粒を6Mグアニジンで可溶化後、1Mジチオスレイトールを1/10量加えて100°C 2分で還元を行い、逆相HPLCによって定量したところ本培養によるヒト血清アルブミンの生成量は15~20mg/L/O.Dであった。特開昭61-275229には、大腸菌における最高生成量5~10mg/L/O.Dが記載されている。本発明による生成量は、この最高生成量を2倍以上上回るものである。

【0048】

## 【実施例3】

## 【ヒト血清アルブミンの枯草菌における分泌生産】

本発明者らは、まず枯草菌のベクターとして多用されるpUB110 (J. Bacteriol. 134, 318 (1978))と大腸菌のベクターpBR327 (Gene 9, 287 (1980))とをEcoRI部位で連結し、大腸菌と枯草菌の両方で複製可能なシャトルベクターpBU4371を構築した。pBU4371は、大腸菌ではアンピシリン耐性、枯草菌ではカナマイシン耐性を賦与する(図9)。

13

【0049】枯草菌の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子amyEのうち、 $\alpha$ -アミラーゼの発現と分泌に必要な部分は、約0.4 kbの領域に存在しており、大腸菌 $\beta$ -lactamaseを枯草菌で分泌するプラスミドpTUB256 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 134, 624, (1986)) では、この領域が0.4 kb HindIII断片として得られる。

【0050】図10は、 $\alpha$ -アミラーゼの分泌に必須であり分泌時には切り離されるシグナルペプチドの切断点(A1a33)付近のアミノ酸配列及びDNA配列を示している。任意のタンパク質の遺伝子を介在配列なしにシグナルペプチド切断点の直後に連結するためには、切断点の直前と目的遺伝子のN末端の直後に、アミノ酸配列を変えることなくユニークな制限酵素部位を配置し、その間を切断点とN末端を丁度つなげるようなアミノ酸配列をコードする合成DNAで連結するとよい。切断点付近のアミノ酸配列から考えられるDNA配列をもとに可能な制限酵素部位を検索したところ、HapII部位の直後、A1a30をコードする配列をGCTからGCCに置換することによって唯一のNotI部位が導入できることが判った。

【0051】そこで、図11のような合成DNAをApplied Biosystems社製のDNA合成機を用いて作製し、次に図12のようにして汎用分泌ベクターpASEC1を構築した。pASEC1は、これをNotIとSmaIで切断し、任意の目的遺伝子の3'末端を平滑化してN末端付近の適当な制限酵素Eで切断しておき、両者を5'末端がNotI cohesiveで3'末端が制限酵素Eに合うような合成DNAで連結することによって、amyEのシグナルペプチド切断点と任意の目的蛋白とが直接連結した遺伝子を構築することができるようになっている。

#### 【0052】HSA分泌プラスミドの構築

まず図13に示すような2本の合成DNAを作製した。この2つの合成DNAと実施例1で構築した全合成ヒト血清アルブミン遺伝子を含むプラスミドpHSA(図3参照)及びプラスミドpUC19とから、プラスミドpUC33HSAを構築した(図13)。

【0053】このプラスミドpUC33HSAの構築の詳細を以下に示す。

【0054】即ち、pHSAをFokIとBamHIで切断し、最も大きな断片(合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大部分を含む1.8 kb断片)を調製する。一方、pUC19をBamHIとHindIIIで切断しておく。これらと図13中に示した2本の合成DNAとをT4リガーゼで連結し、目的のプラスミドpUC33HSAを構築した。

【0055】さて次にプラスミドpUC33HSAを制限酵素BamHIで処理した後にクレノウ処理し、次いでNotIで処理することによって得られた1.8 kb

14

の断片と、プラスミドpASEC1をNotI, SmaIで処理して得た7.5 kbの断片とをT4リガーゼを用いて結合させた。このようにして得られたプラスミドがヒト血清アルブミン分泌プラスミドpAMY33HSA4である(図14)。

#### 【0056】枯草菌によるヒト血清アルブミンの分泌

当業者ならば容易に入手し得る枯草菌1A510株(J. Bacteriol. 165, 934 (1983))を上述のプラスミドpAMY33HSA4でプロトプラスト法により形質転換し、形質転換株1A510/pAMY33HSA4を得た。

【0057】このようにして得た形質転換株1A510/pAMY33HSA4とコントロールとしてプラスミドpBU4371を有する形質転換株1A510/pBU4371との両方をトリプトン、酵母エキス、NaCl、カゼインを含む培地で37°Cで振盪培養した。14, 16, 18時間で培養液をサンプリングし、培養上清を1μlずつ1回及び5回ナイロンメンプランにスポットして抗ヒト血清アルブミン抗体を用いてドットイムノプロッティングを行なったところ、図15に示すように、ヒト血清アルブミンが培地に分泌生成していたことが確認された。なお、同図中においてStandardsは、SIGMAのEssential globulin free HUMAN Albuminを用いた。Brothの位置には、培地をスポットした。図中の1, 2, 4, 5の位置には1A510/pAMY33HSA4を、3, 6の位置には1A510/pBU4371をそれぞれスポットした。

【0058】形質転換株1A510/pAMY33HSA4(AJ12493)と1A510/pBU4371(AJ12492)は、工業技術院微生物工業研究所に寄託されている。その寄託番号は、1A510/pAMY33HSA4がFERMP-11207で、1A510/pBU4371がFERMP-11206である。

#### 【0059】

#### 【実施例4】

#### 【全合成ヒト血清アルブミン遺伝子の構築】

#### 遺伝子の設計

実施例1と同様の順番に条件を考慮しながら遺伝子の設計を行った。ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列は複数の文献によって開示されているが、それらは互いに少しずつ相違がある(FEBS LETTERS 58, 134, (1975), Nucleic Acids Research 9, 6103, (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 71, (1982), J. Biol. Chem. 261, 6747, (1986))。

【0060】本発明者らは、一般にDNAの配列を求める方がアミノ酸の配列を求めるよりも信頼性が高いと考え

えられること、mRNAから逆転写によって作成されるcDNAでは、逆転写の際に塩基の間違いが生じ易いこと、報告された年次が新しいことの3つの理由により、ヒト染色体上のアルブミン遺伝子のDNA塩基配列とアミノ酸配列を決定した文献に報告されているアミノ酸配列が最も信頼性が高いと判断し、J. Biol. Chem. 261, 6747, (1986) に報告されたアミノ酸配列を採用した。

【0061】コンピュータを用いてアミノ酸配列から取り得る制限酵素部位を検索し、それをもとにして大腸菌\*10

TTC-Phe 1( .17%)	TCT-Ser 15( 2.55%)	TAT-Tyr 0( .00%)	TGT-Cys 0( .00%)
TTC-Phe 9( 5.10%)	TCC-Ser 8( 1.38%)	TAC-Tyr 18( 3.08%)	TGC-Cys 3( 5.85%)
TAA-Leu 0( .00%)	TCA-Ser 1( .17%)	TAA--- 0( .00%)	TGA--- 0( .00%)
TTG-Leu 0( .00%)	TCG-Ser 0( .00%)	TAG--- 0( .00%)	TGG-Tyr 1( .17%)
CCT-Leu 3( .51%)	CCY-Pro 0( .00%)	CAT-His 0( .00%)	CGT-Arr 13( 2.13%)
CTC-Leu 1( .17%)	CCC-Pro 0( .00%)	CAC-His 18( 2.72%)	CGC-Arr 10( 1.70%)
CTA-Leu 3( .51%)	CCA-Pro 1( .17%)	CAA-Gln 1( .17%)	CGA-Arg 1( .17%)
CTG-Leu 5( 8.15%)	CCG-Pro 23( 3.91%)	CAG-Gln 18( 3.23%)	CGG-Arg 0( .00%)
ATT-Ile 0( .00%)	ACT-Thr 7( 1.38%)	AAT-Ala 0( .00%)	AGI-Ser 0( .00%)
ATC-Ile 6( 1.38%)	ACG-Thr 7( 1.38%)	AAC-Asn 17( 2.89%)	AGC-Ser 0( .00%)
ATA-Ile 0( .00%)	ACA-Thr 0( .00%)	AAA-Lys 57( 8.89%)	AGA-Arg 0( .00%)
ATG-His 6( 1.02%)	AGC-Thr 0( .00%)	AAG-Lys 24( 3.4%)	AGG-Arg 0( .00%)
GTT-Val 17( 2.89%)	GCT-Ala 22( 3.74%)	GAT-Ala 1( .17%)	GGT-Gly 0( 1.52%)
GTC-Val 1( .17%)	GCC-Ala 0( .00%)	GAC-Abs 35( 5.95%)	GGC-Gly 0( .00%)
GTA-Val 13( 2.21%)	GCA-Ala 22( 3.74%)	GAA-Glu 58( 9.88%)	GGA-Gly 0( .00%)
GIG-Val 10( 1.70%)	GCG-Ala 2( .34%)	GAG-Glu 4( .08%)	GGG-Gly 0( .00%)

【0065】下線を施した部分は、大腸菌で大量に発現するとされている遺伝子に広く用いられているコドン（メジャーコドン）と、一種類しかない、メチオニン、トリプトファン、それにコドンユーチェージに片寄りが見られないシスティンのコードである（参考文献：細胞工学，2, 1541 (1983)）。上記のようにほとんどメジャーコドンを用いて遺伝子を設計することができ※

TIT-Phe 21( 3.58%)	TCT-Ser 3( .51%)	TAT-Tyr 12( 2.05%)	TGT-Cys 15( 2.58%)
TTC-Phe 10( 1.71%)	TCC-Ser 5( .85%)	TAC-Tyr 8( 1.02%)	TGC-Cys 20( 3.41%)
TAA-Leu 10( 1.71%)	TCA-Ser 8( 1.02%)	TAA--- 1( .17%)	TGA--- 0( .00%)
TTG-Leu 12( 2.05%)	TCG-Ser 2( .34%)	TAG--- 0( .00%)	TGG-Tyr 1( .17%)
CCT-Leu 17( 2.90%)	CCT-Pro 10( 1.71%)	CAT-His 11( 1.88%)	CGT-Arr 1( .17%)
CTC-Leu 6( 1.02%)	CCC-Pro 8( 1.02%)	CAC-His 5( .85%)	CGC-Arr 1( .17%)
CTA-Leu 4( .88%)	CCA-Pro 7( 1.19%)	CAA-Gln 11( 1.88%)	CGA-Arg 2( .34%)
CTG-Leu 12( 2.05%)	CCG-Pro 1( .17%)	CAG-Gln 9( 1.51%)	CGG-Arg 2( .34%)
ATT-Ile 3( .51%)	ACT-Thr 7( 1.38%)	AAT-Ala 1( .17%)	AGT-Ser 6( 1.02%)
ATC-Ile 4( .88%)	ACG-Thr 7( 1.38%)	AAC-Ala 8( 1.02%)	AGC-Ser 2( .34%)
ATA-Ile 1( .17%)	ACA-Thr 1( .17%)	AAA-Lys 40( 8.83%)	AGA-Arg 13( 2.22%)
ATG-His 6( 1.02%)	AGC-Thr 2( .34%)	AAG-Lys 19( 3.24%)	AGG-Arg 4( .68%)
GTT-Val 17( 2.05%)	GCT-Ala 23( 4.85%)	GAT-Asp 25( 4.27%)	GGT-Gly 2( .34%)
GTC-Val 7( 1.19%)	GCC-Ala 14( 2.38%)	GAC-Asp 11( 1.88%)	GGC-Gly 3( 1.02%)
GTA-Val 7( 1.19%)	GCA-Ala 17( 2.90%)	GAA-Glu 38( 6.16%)	GGG-Gly 1( .17%)
GIG-Val 15( 2.58%)	GCG-Ala 2( .34%)	GAG-Glu 24( 4.10%)	GGG-Gly 1( .17%)

【0067】さて、図16に示した配列において、最初にあるAAGCTTの Hind III 部位は遺伝子構築の便宜上、付加したものである。またN末端近くにユニークな制限酵素部位を導入する目的で、認識部位と切断部位とが離れているFok Iを図2のように導入して切り離すようにした。

【0068】Fok Iは認識部位の9塩基／13塩基（上側鎖／下側鎖）3'側を切断するので、認識部位を図2のようにアミノ酸配列の5'に隣接して置くことにより血清アルブミン遺伝子のN末端近くで切断できるようになる。ただしこのためには、遺伝子中のFok I認識配列を全て除いておく必要がある。

【0069】遺伝子全体の構築に用いる制限酵素はHind III, Kpn I, Sal I, Pst I, Xba

\*で汎用されているコドンを選びながら制限酵素部位の取捨選択を行い、DNA配列の最初の候補を作成した。

【0062】その候補配列をコンピュータの高次構造検索プログラムに入力し、著しい二次構造を検索し、取り除いた。最終的に決定した遺伝子の塩基配列を図16に示した。

【0063】この設計した遺伝子でのコドンの使用割合を以下に示した。

【0064】

【表3】

20※た。アミノ酸配列のもとにした文献のヒト血清アルブミンをコードするエクソン部分のDNA配列について同じことを行なうと以下のようになり、大腸菌におけるメジャーコドンの使用頻度はむしろ低いことが判明した。

【0066】

【表4】

I, Sph I, Bam HIとした。これらの酵素での切断点地図を図17に示した。

【0070】DNAの化学合成

40 設計したDNA配列（図16）を図18のようにフラグメントに分割し、Applied Biosystems社のDNA合成機を用いて各々のフラグメントの両鎖をホスホアミダイト法（Tetrahedron Letters 22, 1859 (1981)）によりそれぞれ合成した。

【0071】遺伝子の構築

合成したDNAの260 nmの吸光度を測定して濃度を決定した後に、1回の操作で約100ピコモルを用いた。図17, 18に示した制限酵素で8つのブロックにわけ、各ブロックを構成する各断片の両鎖をアニール

17

し、T4リガーゼでライゲーションして各ブロックに相当する断片を生成させ、それらをpUC18もしくはpUC19にクローン化した。クローン化した各ブロックのDNA配列をジデオキシ法(Science, 214, 1205 (1981))によって少なくとも2回にわたって確認した後、各ブロックの断片を調製した。次に各断片約1μgとpUC18またはpUC19約1μgを用いてライゲーションを行い、ブロック1, 2, 3とブロック4, 5と、ブロック6, 7, 8とをそれぞれ連結した中間的ブロックをpUC18またはpUC19にクローン化した。最後に3つの中間的ブロック約1μgとpUC19約1μgを用いてライゲーションを行い、全ブロックを連結した目的の遺伝子を含むプラスミドpHSAE2を構築した(図17)。

## 【0072】

【実施例5】[全合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大腸菌での発現(1)]

前出の方法と合成機を用いて図5に示すような合成DNAを作成した。なお、同図中、SDはリボソーム結合部位を表す。次にこの合成DNAと先ほど作成したプラスミドpHSAE2及びプラスミドpT13s(Nco)(J. Biochem., 104, 30 (1988))とから図19に示すように発現プラスミドpSDHSAE12を作成した。なお、プラスミドpT13s(Nco)は、工業技術院微生物工業研究所に寄託されている保持菌株AJ12447(FERM-P-10757)から調製した。

【0073】この発現プラスミドpSDHSAE12の調製の詳細は以下の通りである。即ち、pHSAE2をFokIとBamHIで切断し、最も大きな断片(合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大部分を含む約1.8kb断片)を調製する。一方、pT13s(Nco)をClaIとBamHIで切断し、大きい方の断片(trpプロモーター、ターミネーター、アンビシリントリニティ遺伝子を含む約2.6kb断片)を調製する。この両者と図5に示した合成DNAとをT4リガーゼでライゲーションしてpSDHSAE12を構築した。

【0074】このようにして得られたプラスミドpSDHSAE12は、trpプロモーター-オペレーターの制御下、Met残基に成熟型HSAが直接連結した蛋白を発現するように設計されており、転写ターミネーターとしてtrpAターミネーターを備えている。

【0075】次にこの発現プラスミドpSDHSAE12で通常よく用いられる塩化ルビジウム法を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、形質転換株HB101/pSDHSAE12を得た。この株をグルコース、酵母エキス、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, ビタミンB1を含む培地で培養した。培養開始後4時間でインドールアクリル酸による誘導をかけ、誘導後約15時間培養したところ、菌体内に顆粒が生成してい

18

た。

【0076】集菌後、20mM Tris-HCl 30mM NaCl 0.5M EDTAバッファーに懸濁し、0.25mg/mlリゾチームで0℃1時間処理後、超音波破碎した。顆粒を低速遠沈後、20mM Tris-HCl 30mM NaCl 0.5M EDTAバッファーにて洗浄、再び遠沈し、10mM EDTA溶液に懸濁し、顆粒画分とした。

【0077】図7(A)はHB101, HB101/pSDHSAE12の全菌体蛋白及び顆粒画分をSDSポリアクリルアミド電気泳動した図である。図中の1, 2, 3, Mの略号は以下の通りである。

## 【0078】

1. HB101全菌体蛋白

2. HB101/pSDHSAE12全菌体蛋白

3. HB101/pSDHSAE12顆粒画分

M. 分子量マーカー

HB101/pSDHSAE12の菌体蛋白には、宿主のHB101には見られない分子量約67Kのバンドが認められ、それは、顆粒画分に回収されている。ヒト血清アルブミンの分子量は約67Kであり、予定された分子量の蛋白が顆粒として生成していることがわかった。

【0079】図7(A)と同様の電気泳動後(蛋白量は1/30)、抗HSA抗体でウェスタンプロットを行なうと図7(B)のようなパターンになり、顆粒状生成した蛋白は抗ヒト血清アルブミン抗体と反応することが示された。

【0080】顆粒を6M塩酸グアニジンで可溶化し、ジチオスレイトールを加えて(final 0.1M) 100℃2分処理後、逆相HPLCで顆粒蛋白を精製した。これをアミノ酸シーケンサーにかけ、N末端付近のアミノ酸配列を調べたところ、図8のように、調べた16アミノ酸残基の全てが一致した。なお、同図中、Observedは実際に観察された配列を、Predictedは予定した配列をそれぞれ示す。

【0081】以上のことから、大腸菌においてN末端にMet残基の付加した形でヒト血清アルブミンを顆粒状に生成することができたことが示唆された。

【0082】形質転換株HB101/pSDHSAE12(AJ12576)は、工業技術院微生物工業研究所に寄託されている(FERM-P-11804)。

【0083】顆粒を6Mグアニジンで可溶化後、1Mジチオスレイトールを1/10量加えて100℃2分で還元を行い、逆相HPLCによって定量したところ本培養によるヒト血清アルブミンの生成量は15~20mg/L/O.Dであった。特開昭61-275229には、大腸菌における最高生成量5~10mg/L/O.Dが記載されている。本発明による生成量は、この最高生成量を2倍以上上回るものである。

【0084】

## 【実施例6】

## 【ヒト血清アルブミンの枯草菌における分泌生産】

本発明者らは、まず枯草菌のベクターとして多用されるpUB110 (J. Bacteriol. 134, 318 (1978)) と大腸菌のベクターpBR327 (Gene 9, 287 (1980)) をEcoRI部位で連結し、大腸菌と枯草菌の両方で複製可能なシャトルベクターpBU4371を構築した。pBU4371は、大腸菌ではアンピシリン耐性、枯草菌ではカナマイシン耐性を賦与する(図9)。

【0085】枯草菌の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子amyEのうち、 $\alpha$ -アミラーゼの発現と分泌に必要な部分は、約0.4kbの領域に存在しており、大腸菌 $\beta$ -lactamaseを枯草菌で分泌するプラスミドpTUB256 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 134, 624, (1986)) では、この領域が0.4kb HindIII断片として得られる。

【0086】図10は、 $\alpha$ -アミラーゼの分泌に必須であり分泌時には切り離されるシグナルペプチドの切断点(A1a33)付近のアミノ酸配列及びDNA配列を示している。任意のタンパク質の遺伝子を介在配列なしにシグナルペプチド切断点の直後に連結するためには、切断点の直前と目的遺伝子のN末端の直後に、アミノ酸配列を変えることなくユニークな制限酵素部位を配置し、その間を切断点とN末端を丁度つなげるようなアミノ酸配列をコードする合成DNAで連結するとよい。切断点付近のアミノ酸配列から考えられるDNA配列をもとに可能な制限酵素部位を検索したところ、HapII部位の直後、A1a30をコードする配列をGCTからGCに置換することによって唯一のNotI部位が導入できることが判った。

【0087】そこで、図11のような合成DNAをApplied Biosystems社製のDNA合成機を用いて作製し、次に図12のようにして汎用分泌ベクターpASEC1を構築した。pASEC1は、これをNotIとSmaIで切断し、任意の目的遺伝子の3'末端を平滑化してN末端付近の適当な制限酵素Eで切断しておき、両者を5'末端がNotI cohesive endで3'末端が制限酵素Eに合うような合成DNAで連結することによって、amyEのシグナルペプチド切断点と任意の目的蛋白とが直接連結した遺伝子を構築することができるようになっている。

## 【0088】HSA分泌プラスミドの構築

まず図20に示すような2本の合成DNAを作製した。この2つの合成DNAと実施例4で構築した全合成ヒト血清アルブミン遺伝子を含むプラスミドpHSAE2(図17参照)及びプラスミドpUC19とから、プラスミドpUC33HSAEを構築した(図20)。

【0089】このプラスミドpUC33HSAEの構築の詳細を以下に示す。

【0090】即ち、pHSAE2をFokIとBamHIで切断し、最も大きな断片(合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大部分を含む1.8kb断片)を調製する。一方、pUC19をBamHIとHindIIIで切断しておく。これらと図20中に示した2本の合成DNAとをT4リガーゼで連結し、目的のプラスミドpUC33HSAEを構築した。

【0091】さて次にプラスミドpUC33HSAEを制限酵素BamHIで処理した後にクレノウ処理し、次いでNotIで処理することによって得られた1.8kbの断片と、プラスミドpASEC1をNotI, SmaIで処理して得た7.5kbの断片とをT4リガーゼを用いて結合させた。このようにして得られたプラスミドがヒト血清アルブミン分泌プラスミドpAMY33HSAE2である(図21)。

【0092】枯草菌によるヒト血清アルブミンの分泌当業者ならば容易に入手し得る枯草菌1A510株(J. Bacteriol. 165, 934 (1983))を上述のプラスミドpAMY33HSAE2でプロトプラスト法により形質転換し、形質転換株1A510/pAMY33HSAE2を得た。

【0093】このようにして得た形質転換株1A510/pAMY33HSAE2とコントロールとしてプラスミドpBU4371を有する形質転換株1A510/pBU4371との両方をトリプトン、酵母エキス、NaCl、カゼインを含む培地で37℃で振盪培養した。14, 16, 18時間で培養液をサンプリングし、培養上清を1μlずつ1回及び5回ナイロンメンプランにスポットして抗ヒト血清アルブミン抗体を用いてドットイムノプロッティングを行なったところ、図15に示すように、ヒト血清アルブミンが培地に分泌生成していたことが確認された。なお、同図中においてStandardは、SIGMAのEssential globulin free HUMAN Albuminを用いた。Brothの位置には、培地をスポットした。図中の1, 2, 4, 5の位置には1A510/pAMY33HSAE2を、3, 6の位置には1A510/pBU4371をそれぞれスポットした。

【0094】形質転換株1A510/pAMY33HSAE2(AJ12578)と1A510/pBU4371(AJ12492)は、工業技術院微生物工業研究所に寄託されている。その寄託番号は、1A510/pAMY33HSAE2がFERM P-11806で、1A510/pBU4371がFERM P-11206である。

## 【0095】

【実施例7】【全合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大腸菌での発現(2)】  
大腸菌でのもう1つの発現プラスミドを図22のようにして構築した。即ち、まず実施例5で構築したプラスミ

21

K p S D H A S E 1 2 の t r p A ターミネーターを含む  
0. 3 k b BamH I - Hinc II 断片を p H S G  
2 9 9 の BamH I - Hinc II サイトに連結し、p  
K T 9 1 を構築する。次に p S D H A S E 1 2 の t r p  
プロモーターを含む 8 0 b p EcoRI - ClaI 断  
片と、ヒト血清アルブミン遺伝子を含む 1. 8 k b C  
la I - BamH I 断片とを p K T 9 1 の EcoRI -  
BamH I サイトに連結し、目的のプラスミド p K T 9  
1 H S A E 4 を得た。

【0096】 次にこの発現プラスミド p K T 9 1 H S A  
E 4 で通常よく用いられる塩化ルビジウム法を用いて大  
腸菌 HB 1 0 1 株を形質転換し、形質転換株 HB 1 0 1  
/ p K T 9 1 H S A E 4 を得た。この株を実施例 5 と同  
様な培地で培養を行ったところ、やはり菌体内に顆粒が  
生成した。

【0097】 実施例 5 と同様に顆粒を調製し、同様にヒ  
ト血清アルブミンの定量を行ったところ、生成量は 8 0  
~ 9 0 mg/L/O. D であり、実施例 5 の生成量をさ  
らに 4 倍以上上回るものであった。

【0098】 HB 1 0 1 / p K T 9 1 H S A E 4 (A J  
1 2 5 7 7) は、工業技術院微生物工業研究所に寄託さ

22

れている (FERM P-11805)。

【0099】

【発明の効果】 原核生物が好んで用いるコドンを多用す  
るようにしてデザインした合成DNAを用いて目的とする  
ヒト血清アルブミンを生産させる本発明は、c DNA  
を用いてヒト血清アルブミンを微生物に生産させる従来  
の方法の不完全さを是正し、より効率的な蛋白質生産を行  
う上で極めて重要なものである。

【0100】

10 【配列表】 配列番号：1

配列の長さ：1 7 8 1

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：c l e a v a g e - s i t e

存在位置：2 1 .. 2 6

特徴を決定した方法：S

20 配列

【0101】

23

24

## 配列表(配列番号1)

10            20            30            40  
 5' AA GCTTGGGATG GAC GCT CAC AAA TCC GAA GTT GCG CAC CGT TTT AAA  
 Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys

50            60            70            80            90  
 GAC CTG CGT GAG GAA AAC TTC AAA GCG CTG GTT CTG ATC GCT TTC GCT  
 Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala

100          110          120          130          140  
 CAG TAC CTT CAG CAG TGC CCG TTC GAG GAC CAC GTT AAA CTG GTA AAC  
 Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn

150          160          170          180          190  
 GAA GTA ACC GAA TTC GCT AAA ACC TGC GTA GCT GAC GAA TCT GCA GAA  
 Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu

200          210          220          230          240  
 AAC TGC GAC AAA TCC CTG CAC ACC CTG TTC GGT GAC AAA CTG TGC ACT  
 Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr

250          260          270          280  
 GTT GCC ACC CTC CCC GAA ACC TAC CCT CAA ATG CCT GAC TGC TGC GCT  
 Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala

290          300          310          320          330  
 AAA CAG GAA CCG GAA CCC AAC GAA TGC TTC CTT CAG CAC AAA GAC GAC  
 Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp

340          350          360          370          380  
 AAC CCG AAC CTG CCG CGC CTG GTT CGT CCG GAA GTC GAC GTA ATG TGC  
 Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys

390          400          410          420          430  
 ACC GCA TTC CAC GAC AAC GAA GAA ACC TTC CTG AAA AAA TAC CTG TAC  
 Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr

440          450          460          470          480  
 GAA ATC GCA CGC CGT CAC CCG TAC TTC TAC GCA CGC GAA CTG CTG TTC  
 Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe

[0102]

25

26

490            500            510            520  
 TTC GCT AAA CGT TAC AAA GCA GCT TTC ACT GAA TGC TGC CAG GCG  
 Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala  
  
 530            540            550            560            570  
 GCT GAC AAA CGG GCA TGC CTG CTG CCG AAA CTG GAC GAA CTG CGT GAC  
 Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp  
  
 580            590            600            610            620  
 CAA GGT AAG GCG TCT TCT GCA AAA CAG CGT CTG AAA TCC GCT TCT CTC  
 Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu  
  
 630            640            650            660  
 CAG AAA TTC GGT GAA CGT GCA TTC AAA CGG TGG GCA GTT GCG CGC CTG  
 Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu  
  
 670            680            690            700            710  
 TCC CAG CGC TTC CCG AAA GCA GAA TTC GCA GAA GTG TCT AAA CTG GTT  
 Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val  
  
 720            730            740            750            760  
 ACT GAC CTG ACC AAA GTT CAC ACC GAA TCC TGC CAC GGC GAC CTT CTA  
 Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu  
  
 770            780            790            800            810  
 GAG TGC GCA GAC GAC CGT CGG GAC CTG CGC AAA TAC ATC TGC GAA AAC  
 Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn  
  
 820            830            840            850            860  
 CAG GAC TCC ATC TCT TCT AAA CTG AAA GAA TGC TGC GAA AAA CCG CTG  
 Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu  
  
 870            880            890            900  
 CTG GAA AAA TCT CAC TGC ATC GCA GAA GTA GAA AAC GAC GAA ATG CGG  
 Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro  
  
 910            920            930            940            950  
 GCG GAT CTG CCG TCT CTG CGG GCT GAC TTC GTT GAA TCA AAA GAC GTG  
 Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val

[0103]

27

28

960        970        980        990        1000  
 TGC AAA AAC TAC GCA GAA GCA AAA GAC GTA TTC CTA GGT ATG TTC CTG  
 Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu

1010        1020        1030        1040        1050  
 TAC GAA TAC GCT CGT CCA CAC CCG GAC TAC TCT GTG GTT CTG CTG CTG  
 Tyr Gly Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu

1060        1070        1080        1090        1100  
 CGC CTG GCA AAA ACC TAC GAA ACT ACC CTG GAA AAA TGC TGC GCA GCG  
 Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala

1110        1120        1130        1140        1150  
 GCT GAC CCA CAC GAA TGC TAC GCA AAA GTG TTC GAC GAA TTC AAA CCG CTG  
 Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu

1160        1170        1180        1190        1200  
 GTT GAA GAA CCG CAG AAC TCG ATC AAA CAG AAC TGC GAA CTG TTC AAA  
 Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Lys

1210        1220        1230        1240  
 CAG CTG GGT GAA TAC AAA TTC CAG AAC GCT CTG CTG GTT CGC TAC ACC  
 Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr

1250        1260        1270        1280        1290  
 AAA AAG GTA CCG CAG GTG TCT ACT CCG ACC CTG GTG GAA GTA TCC CGT  
 Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg

1300        1310        1320        1330        1340  
 AAC CTG GGT AAA GTT GGC TCT AAA TGC TGC AAA CAC CCG GAA GCG AAA  
 Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys

1350        1360        1370        1380        1390  
 CGT ATG CCG TGC GCG GAA GAC TAC CTG TCC GTG GTG CTG AAC CAG CTC  
 Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu

1400        1410        1420        1430        1440  
 TGC GTT CTG CAC GAA AAA ACC CCG GTT TCT GAC CGT GTA ACT AAA TGC  
 Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys

[0104]

29

30

1450        1460        1470        1480  
 TGC ACC GAA TCT CTG GTT AAC CGC CGT CCG TGC TTC TCC GCT CTA GAG  
 Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu

 1490        1500        1510        1520        1530  
 GTT GAC GAA ACC TAC GTA CCG AAA GAA TTC AAC GCA GAA ACC TTC ACT  
 Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr

 1540        1550        1560        1570        1580  
 TTC CAC GCG GAC ATC TGC ACC CTG TCC GAA AAA GAA CGC CAG ATC AAA  
 Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys

 1590        1600        1610        1620        1630  
 AAA CAG ACC GCT CTG GTG GAA CTG GTA AAA CAC AAA CCG AAA GCA ACC  
 Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr

 1640        1650        1660        1670        1680  
 AAA GAA CAA CTG AAA GCG GTG ATG GAC GAC TTC GCA GCT TTC GTA GAA  
 Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu

 1690        1700        1710        1720  
 AAA TGC TGC AAA CCT GAC GAC AAA GAA ACC TGC TTC CCT GAA GAA CCT  
 Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly

 1730        1740        1750        1760        1770  
 AAA AAA CTG GTA GCT GCG TCT CAG GCT GCA CTG GGC CTG TAATGATAGG  
 Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu

 1780  
 ATCC 3'

## 【0105】配列番号：2

配列の長さ：1781

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

## 配列の特徴

特徴を表す記号：c l e a v a g e - s i t e

存在位置：21..26

特徴を決定した方法：S

30 配列

## 【0106】

31

32

## 配列表(配列番号2)

10	20	30	40	
5' AA GCTTGGATG	GAC GCT CAC	AAA TCC GAA GTT GCG	CAC CGT TTT AAA	
Asp Ala His	Lys Ser Glu Val	Ala His Arg Phe Lys		
50	60	70	80	90
GAC CTG GGT GAG	GAA AAC TTC	AAA GCG CTG GTT CTG ATC	GCT TTC GCT	
Asp Leu Gly	Glu Glu Asn Phe	Lys Ala Leu Val	Leu Ile Ala Phe Ala	
100	110	120	130	140
CAG TAC CTT CAG	CAG TGC CCG TTC	GAG GAC CAC GTT AAA CTG GTA AAC		
Gln Tyr Leu	Gln Gln Cys Pro	Phe Glu Asp His Val	Lys Leu Val Asn	
150	160	170	180	190
GAA GTA ACC GAA	TTC GCT AAA ACC TCC GTA GCT GAC GAA TCT GCA GAA			
Glu Val Thr Glu	Phe Ala Lys Thr Cys Val	Ala Asp Glu Ser Ala Glu		
200	210	220	230	240
AAC TGC GAC AAA TCC	CTG CAC ACC CTG TTC GGT	GAC AAA CTG TGC ACT		
Asn Cys Asp Lys	Ser Leu His Thr Leu Phe	Gly Asp Lys Leu Cys Thr		
250	260	270	280	
GTT GCG ACC CTG CCC	GAA ACC TAC GGT	GAA ATG GCT GAC TGC TGC GCT		
Val Ala Thr Leu Arg	Glu Thr Tyr Gly	Met Ala Asp Cys Cys Ala		
290	300	310	320	330
AAA CAG GAA CCG	GAA CGC AAC GAA TGC TTC	CTT CAG CAC AAA GAC GAC		
Lys Gln Glu Pro	Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu	Gln His Lys Asp Asp		
340	350	360	370	380
AAC CCG AAC CTG CCG CGC	CTG GTT CGT CCG GAA GTC GAC GTA ATG TGC			
Asn Pro Asn Leu Pro	Arg Leu Val Arg Pro Glu Val	Asp Val Met Cys		
390	400	410	420	430
ACC GCA TTC CAC	GAC AAC GAA GAA ACC TTC	CTG AAA AAA TAC CTG TAC		
Thr Ala Phe His Asp	Asn Glu Glu Thr Phe Leu	Lys Tyr Leu Tyr		
440	450	460	470	480
GAA ATC GCA CGC CGT	CAC CCG TAC TTC TAC GCA CCG GAA CTG CTG TTC			
Glu Ile Ala Arg Arg	His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro	Glu Leu Leu Phe		

[0107]

33

34

490            500            510            520  
 TTC GCT AAA CGT TAC AAA GCA GCT TTC ACT GAA TGC TGC CAG GCG  
 Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala  
  
 530            540            550            560            570  
 GCT GAC AAA GCG GCA TGC CTG CTG CGG AAA CTG GAC GAA CTG CGT GAC  
 Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp  
  
 580            590            600            610            620  
 GAA GGT AAG GCG TCT TCT GCA AAA CAG CGT CTG AAA TGC GCT TCT CTC  
 Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu  
  
 630            640            650            660  
 CAG AAA TTC GGT GAA CGT GCA TTC AAA GCG TGG GCA GTT GCG CGC CTG  
 Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu  
  
 670            680            690            700            710  
 TCC CAG CGC TTC CCG AAA GCA GAA TTC GCA GAA GTG TCT AAA CTG GTT  
 Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val  
  
 720            730            740            750            760  
 ACT GAC CTG ACC AAA GTT CAC ACC GAA TGC TGC CAC GGC GAC CTT CTA  
 Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu  
  
 770            780            790            800            810  
 GAG TGC GCA GAC GAC CGT CGG GAC CTG CGG AAA TAC ATC TGC GAA AAC  
 Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn  
  
 820            830            840            850            860  
 CAG GAC TCC ATC TCT TCT AAA CTG AAA GAA TGC TGC GAA AAA CCG CTG  
 Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu  
  
 870            880            890            900  
 CTG GAA AAA TCT CAC TGC ATC GCA GAA GAA AAC GAC GAA ATG CCG  
 Leu Glu Lys Ser His Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro  
  
 910            920            930            940            950  
 CGG GAT CTG CCG TCT CTG CGG GCT GAC TTC GTT GAA TCA AAA GAC GTG  
 Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val

[0108]

35

36

960        970        980        990        1000  
 TCC AAA AAC TAC GCA GAA GCA AAA GAC GTA TTC CTA GGT ATG TTC CTG  
 Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu

1010        1020        1030        1040        1050  
 TAC GAA TAC GCT CGT CGA CAC CCG GAC TAC TCT GTG GTT CTG CTG CTG  
 Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu

1060        1070        1080        1090        1100  
 CGC CTG GCA AAA ACC TAC GAA ACT ACC CTG GAA AAA TGC TGC GCA GCG  
 Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala

1110        1120        1130        1140        1150  
 GCT GAC CCA CAC GAA TGC TAC GCA AAA GTG TTC GAC GAA TTC AAA CCG CTG  
 Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu

1160        1170        1180        1190        1200  
 GTT GAA GAA CCG CAG AAC CTG ATC AAA CAG AAC TGC GAA CTG TTC GAA  
 Val Glu Glu Pro Glu Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu

1210        1220        1230        1240  
 CAG CTG CGT GAA TAC AAA TTC CAG AAC GCT CTG CTG GTT CGC TAC ACC  
 Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr

1250        1260        1270        1280        1290  
 AAA AAG GTA CCG CAG GTG TCT ACT CCG ACC CTG GTG GAA GTA TCC CGT  
 Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg

1300        1310        1320        1330        1340  
 AAC CTG GGT AAA GTT GGC TCT AAA TGC TGC AAA CAC CCG GAA GCG AAA  
 Asn Leu Gly Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys

1350        1360        1370        1380        1390  
 CGT ATG CCG TGC GCG GAA GAC TAC CTG TCC GTG GTG CTG AAC CAG CTG  
 Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu

1400        1410        1420        1430        1440  
 TGC GTT CTG CAC GAA AAA ACC CCG GTT TCT GAC CGT GTA ACT AAA TGC  
 Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys

[0109]

37

38

1450        1460        1470        1480  
 TGC ACC GAA TCT CTG GTT AAC CGC CGT CCG TCC TTC TCC GCT CTA GAG  
 Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu

 1490        1500        1510        1520        1530  
 GTT GAC GAA ACC TAC GTA CCG AAA GAA TTC AAC GCA GAA ACC TTC ACT  
 Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr

 1540        1550        1560        1570        1580  
 TTC CAC CGC GAC ATC TCC ACC CTG TCC GAA AAA GAA CGC CAG ATC AAA  
 Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys

 1590        1600        1610        1620        1630  
 AAA CAG ACC GCT CTG GTG GAA CTG GTA AAA CAC AAA CCG AAA GCA ACC  
 Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr

 1640        1650        1660        1670        1680  
 AAA GAA CAA CTG AAA GCG GTG ATG GAC GAC TTC GCA GCT TTC GTA GAA  
 Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu

 1690        1700        1710        1720  
 AAA TGC TGC AAA GCT GAC GAC AAA GAA ACC TGC TTC GCT GAA GAA GGT  
 Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly

 1730        1740        1750        1760        1770  
 AAA AAA CTG GTA GCT GCG TCT CAG GCT GCA CTG GCC CTG TAATGATAGG  
 Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu

 1780  
 ATCC 3'

## 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明者らが設計し、実際に全合成して構築した、ヒト血清アルブミンをコードするDNA配列を示す図である。

【図2】ヒト血清アルブミンのN末端付近に単一の制限酵素切断部位を導入するために配置したF o k I 認識部位と切断部位を示す図である。

【図3】遺伝子中の制限酵素部位の配置を示す図である。なお、矢印はプロック1からプロック8各々の領域と、3つの中間的プロックの領域、及びpHSAが保持する領域を示す。

【図4】図4Aはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのプロック1から3を示す図である。図4Bはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのプロック4、5を示す図である。図4Cはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのプロック6から8を示す図である。

【図5】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌の発現ベクターに接続するために作製した合成DNAを示す図である。なお、SDは、リボソーム結合部位を表す。

【図6】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌で発現するプラスミドp SDHSA 4の構築手順を示す図である。なお、プラスミドp T 13 S (N c o) は、大腸菌

t r p プロモーターを含む公知のプラスミドである。

【図7】ポリアクリルアミド電気泳動図及びウェスタンプロッティング図である。詳細に述べると(A)はSDSポリアクリルアミド電気泳動後、クーマシープルーで

30 タンパク質を染色した図である。また(B)は(A)の1/30量の蛋白を用いて同様の電気泳動後、ゲル内の蛋白をナイロンメンブランにエレクトロトランスファーし、抗ヒト血清アルブミン抗体を用いてウェスタンプロッティングした図である。図中の1, 2, 3, Mの略号は以下の通りである。

1. HB 101全菌体蛋白

2. HB 101/p SDHSAE 12全菌体蛋白

3. HB 101/p SDHSAE 12顆粒画分

M. 分子量マーカー

40 【図8】精製顆粒蛋白のアミノ酸配列を示す図である。Observedは実際に観察された配列、Predictedは予定した配列を示す。

【図9】シャトルベクターp BU 4 3 7 1の構築を示す図である。

【図10】 $\alpha$ -アミラーゼの分泌に必須であり分泌時には切り離される、amy Eのシグナルペプチドの切断点(A1a33)付近のアミノ酸配列及びDNA配列を示す図である。なお、矢印は、A1a33をコードする配列をGCTからGCCに置換することによってNotI

50 部位が生ずること、及びシグナルペプチド切断点を表わ

す。

【図11】分泌ベクター構築のために作製した合成DNAを示す図である。

【図12】分泌ベクターpASEC1の構築図である。

【図13】pASEC1に接続するためのヒト血清アルブミン遺伝子の構築図である。

【図14】ヒト血清アルブミンを枯草菌で分泌するためのプラスミドpAMY33HSA4の構築図である。

【図15】1A510/pAMY33HSA4または1A510/pBU4371の培養14, 16, 18時間目の培養上清1μlを1回及び5回ナイロンメンプランにスポットし、抗ヒト血清アルブミン抗体でプロッティングした図である。Standardsは、SIGMAのEssential globulin free HUMAN Albuminを用いた。Brothの位置には、培地をスポットした。図中の1, 2, 4, 5の位置には1A510/pAMY33HSA4または1A510/pAMY33HSAE2を、3, 6の位置には1A510/pBU4371をそれぞれスポットした。

【図16】本発明者らが設計し、実際に全合成して構築した、ヒト血清アルブミンをコードするDNA配列を示す図である。

【図17】遺伝子中の制限酵素部位の配置を示す図である。

る。なお、矢印はブロック1からブロック8各々の領域と、3つの中間的ブロックの領域、及びpHSAE2が保持する領域を示す。

【図18】図18Aはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック1から3を示す図である。図18Bはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック4, 5を示す図である。図18Cはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック6から8を示す図である。

【図19】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌で発現するプラスミドpSDHSAE12の構築手順を示す図である。なお、プラスミドpT13S(Nco)は、大腸菌trpプロモーターを含む公知のプラスミドである。

【図20】pASEC1に接続するためのヒト血清アルブミン遺伝子の構築図である。

【図21】ヒト血清アルブミンを枯草菌で分泌するためのプラスミドpAMY33HSAE2の構築図である。

【図22】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌で発現するプラスミドpKT91HSAE4の構築手順を示す図である。

### 【図1】

```

1' AACCTTGCGCA TGGACGCTCA CAAATCCGAA CCTTCGCACG CCTTTAAAGA CCTGGGTGAG
   GAAAATTCA AACCGCTGCT TCTGATCGCT TTCCGCTAGT ACCTTCAGCA GTGCCCTTC
   DAGGACCAAG TTAAACTCGT AAACGAAGTA ACCGAATTGCTG CTAAACCTG CCTAGCTCAC
   GAATCTGAG AAAACTCCGA CAAATCCCTG CACACCGCTG TCGGTGACCAA ACTGTGACT
   GTTCCGACCG TCGGGGAAC CTACGGTGAA ATGGCTGACT CCTGGCTGAA ACAGGAACCC
   GAACGCAACG AATGCTCTC TCACACCAA GAGCACACG CGAACCTGGC GCGCCTGTT
   CCTCCCGAAG TCCACGTAAT GTGACACCGCA TTCCACGACA AGCAACAAAC CTTCCCTGAAA
   AAATACTCTT ACCGAAATCGC ACCGGCGTAC CGGTACTTCT ACGGCACCGGA ACTGCTGTT
   TTGCGTAAAC OTTACAAAGC AGCTTTCACT AAATGCTGCG AGCGGCGCTGA CAAAGCGGCA
   TOCCCTGCTG CCAAACTCGA COAAGCTGGT CACGAAGGTAA AGGGCTCTTC TGCAAAACAG
   CCTCTGAAAT GCGCTTCTCT CCACAAATTG CCTGAAACCTG CATTCAAGC GTGGGCAAGT
   CGGGGCTGCTG CCCACCGCTT CCGGAAAGCA GAATTCGCAAG AAGTGTCTA ACTGTTACT
   GACCTGACCA AACTTCACAC CGAAATGCTGC CACGGCGACG TTCTACAGTC CGCACACOAC
   CGTGGCGACC CGTGGGAAATA CATCTCGGAA AACCAAGUACT CCATGCTCTC TAAACTGAAA
   GATCTGCGC AAAAGCGCTG GCTGAAAAAA TCTCACTGCA TCGGAGAACT AGAAAACCGAC
   GAAATGGGG CGGATCTGCC GTCTGTGGG CCTGACTCTG TTGAATCAAA AGACGTGTCG
   AAAAACTTAC CAGAAGGAAAGAGCTATTC CTAGGTATCT TCTGTACCA ATACGCTGCT
   CGACACCCCG ACTACTCTGT CGTCTGCTG CTGCGCTCG CAAAAACCTA CGAAACGCTAC
   CTGGAAAAT GCTGCGGAGC GCGTGACCCA CACGAATGCT ACGGCAAAAGT GTTCACCGAA
   TTCAACCGC TGGTIGARGA ACCCGAGAAC CTGATGAAAC AGAACTGCGG ACTGTTCAA
   CAGCTGGGTG AATAACAAATT CGAGAACCTG CTGCTGCTT GCTACACCAA AAAGCTACCG
   CAGGTCTCTA CTCCGACCT GCTGGAAGTA TCCGCTAACCC TGGTAAAGT TGGCTCTAAA
   TCTGCAAAC ACCGGGAGGC OAAACGTATG CGCTGGCGCG AGACGTACCT GTCCGGTGGC
   CTGAACCGAGC TGTGCGTTCT GCAACGGAAA ACCCGGGTTT CTGACCGTGT AACTAAATCC
   TCCACCGGAT CTCTGTTAA CGGGCGCTCG TOCTTCTCTG CTCTAGAGGT TGACGAAACG
   TACGTACCGA AACAAATGCA CGCAGAAACG TTCACTTCC ACCGGGACAT GTGACACCTG
   TCCGAAAAGC AACCGGAGAT OAAACAAAGC ACCGGCTCTGG TGGAAACTGGT AAAACACAAA
   CGGAAAGGAA CGAAAGAACG ACTCAAGGGG GTGATGAGACG ACTTCGCGACG TTCTGCTAGAA
   AATGCTGCA AACCTGACCA CAAAGAACCG TCTTTCGCTG AACAAGGTTAA AAAACTGGGA
   GCTGGCTCTC AGCGTGGACT CGCCCTGTTAA TGTATGAGTC C'

```

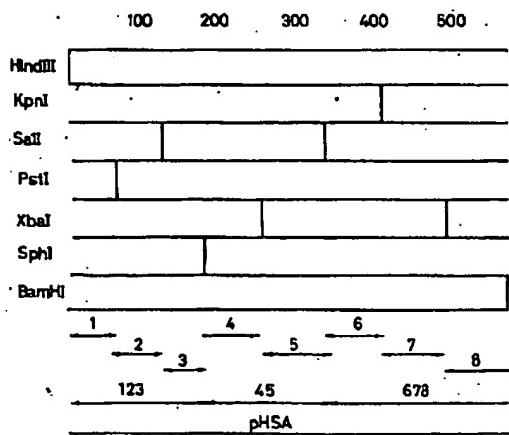
[図2]



## ヒト血清アルブミンのN末端

Asp Pro Ile His Lys Ser Glu Val Ala Lys Arg Phe Lys Asp Leu Glu Glu  
 AAC CTT TGG GAT GG GAC GCT CAC AA ATCC GAAG TT GCG CAC CGT TT AA AG AC CT GGG TGAG  
 TT CGA AAC CCT TA CCT GCG ACT GT TT AG CCT CA ACC CGT CGC AAA ATT T CT GG ACC CACT C  
 Fok I 切断部位 切断部位

[図3]



[図11]

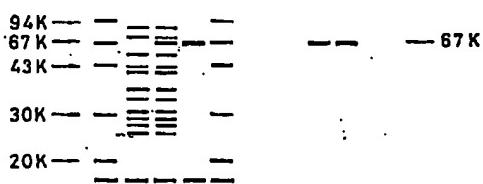
NcoI SacI SmaI EcoRI  
 5' CGCCGCCCCGGGACCTCCC|GGGAATTG  
 CGCCGGGCGCC|TCGAGGGCCCTTAAGAGCT  
 HpaII cohesive Sall cohesive

[図5]

SD Met Asp Ala His  
 5' CGATTAGTAAGGAGGTTAAATGGACGCTCAC  
 TAATCATTCTCCAAATTTACCTGCGAGTGTTTA  
 Cla I cohesive Fok I cohesive

[図7]

(A) M 1 2 3 M M 1 2 3 M



(图4)

プロセス

```

Bied II
ACCTTGGATGCCGCTACAAATCCGAAGTTGGCCCACTGTTTAAGACCTCGTGADGA
ACCCATCTCGGACTGTTCAGCCTAACCGCTGGCAAAATTCTGGACCCACTCTTTGAAGT
AACTTCAAGCCCTGCTTCTGATCGCTTTCGCTCACTCTCCAGCACTGCCCGCTGGAGGA
TGCACCACTAGCTAACCAAGGCTGATCTGAACTGCTAACCGCCAACTGCTGCAAT
CCACCTTAAACTGCTAACCGAATGAACTCCGATTCCTCAAACTCTGGCTACCTGACGAATCTGCA
TTGACCTTTGGCTTCTATGGCTTAAAGCTATTTGGACCCATGCTACTCTGAACTTGAAGT

```

ブロツク  
 SphI  
 CCTGCTGCCAAATCGCAGAACCTGGTGAAGAACGTAAGGCGCTTCCTCCAAA  
 GTACGAGACGGCTTGTGACTCTGGTCAAGCCATGCTCCATTCTGGAGAACGCTTGTGCTCCAG  
 CAGGGTTGAAATGCTTCTCCAGAATACTCTGCTGCTGCTGCTTCAAAAC  
 ACTTTACGCCAAAGAGGGCTTAAAGCCATTGCTGACTTAATTCGCCACCCCTC  
 CTGGGGACTCTGCCGCTCTGCTCCAGCGCTTCCGAAACCCAGATTCGAGAAGT  
 AACCCCGEEAACCCGGCTTCCGAACTTCTGCTTAAAGCGCTTCTCCAGATTC  
 CTCTAACTGGTATCGACCTGACCAAAAGTCACAGCGATGCTGGCGACCTT  
 ACCAAATGCTGACTGTTCAACTTGCTGCTTACAGCGTGCCTGAGACATE

プロセス

Pal II  
 - GAAACTCCGACAAATCCCTGCACACCGTGTGGTGACAACTGTCAGGCTGGCAACCTCGGC  
 ACCCTTTTGACCTTGTAGGGCATGCTGGCAAGGCCACTGTGACAGCAGCTT  
 - GAAACTACGGCTGAAATGCTGTGCTGCGCTAAACCGAACGGGAACGGCAACGGATGCTCT  
 CCCACCGGCTTTGGCACCTTACCGCATGCAAGCCATTGTGCTTGGCTTGCTT  
 - TCAAGCAAAAGACGACACACCGGAACTGCTGGGGCTGTGGTGCTGGGAAG  
 ACRAAGGAACTTGTGCTTCTGCTTGGCTTGGACGCCACAAAGGGCTTCAAGCT  
 Sai I

プロトクル  
 Xba I  
 CTAGACTGCCAGACCACTGCGACETGGCCAAATACATCTCCAAACCCAGGACTCCAT  
 TCACGCTCTCGCTGGACGGCTGTGAGCCCTTTATGTAGACGGTTTGGCTCTGAGGAGAT  
 CTCTCTAACTGAAGAATGCTCCGAAAAACCGCTGCTGAAATACTCACTGCATECCAGA  
 TIGCTTCTTACGACCTTTGGCGACGCTTTTACGACTCACTAACCTCTTCATCTT  
 CTAGAAACCCAAATCCGGGATCTGGCTTCTGCGCTTACCTGTAATCAAAGC  
 GCTGCTACGGCCCTAGACCCAGAAGACCCGCGCAACCTAACCTATTGCTCACGCTT  
 GCTGCGAAACCTACGGAGAACCCAAAGCGATTGCTCTGCTGACGGATACGGCTG  
 TTGCTGCTCTTCTGCTACGAGTCATACGAGCTATGCGACGCTT

۷۰۲۳

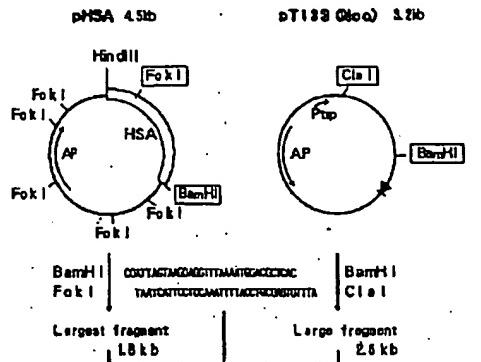
541  
 TCCACGCTAAATGTCGACCCGATTTCCACGGCAACGGAAAGAACCTTCTGTAAAAAATAC  
     GCTTAAACCGCTGGCTAAAGCTTGCTGCTTCTTTGGAGACTTTTTTGTGAGATGCT  
  
 CTGTCACCAAACTGCCACCCGGCTCACCGCTACTTETACGCACGGGAAGCTGTGTTCTG-  
     TTACGCTGGCGACGATGCGCATGAAAGCTGGCTGGCTGACGAGAAACGATTTC  
  
 CTAAACGTTACAAAGCAGCTTCTAGTAATGTCGCAACGGCTCTAACAAACGGCGATC  
     ATGCTTCTCGGAAAGTGACTTACAGCTGCTGGCGACTGTTCGEE  
Sohi

•图4A

4B

图 4c

[図6]

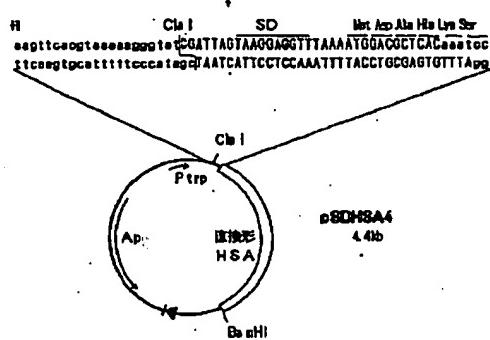


〔図8〕

Observed : Met-Asp-Ala-His-Lys-Ser-Glu-Val-  
Predicted : Met-Asp-Ala-His-Lys-Ser-Glu-Val-

**Ala-His-Arg-Phe-Lys-Asp-Leu-Gly**

[図10]



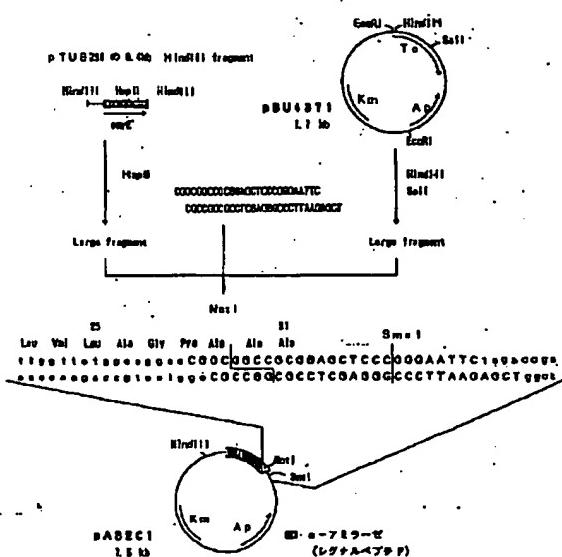
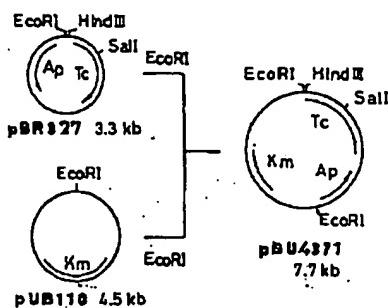
シグナルベブチド切断

**2 5 10 15** ↓  
**LouValLeuAlaGlyProAlaAlaAlaSerAlaGluTbrAlaAsnLysSerAsn**  
**TTGGCTCTGGCACGGACCCGGGGCTCCGAGTGTCAAACCGCGAACAAATCGGAAT**

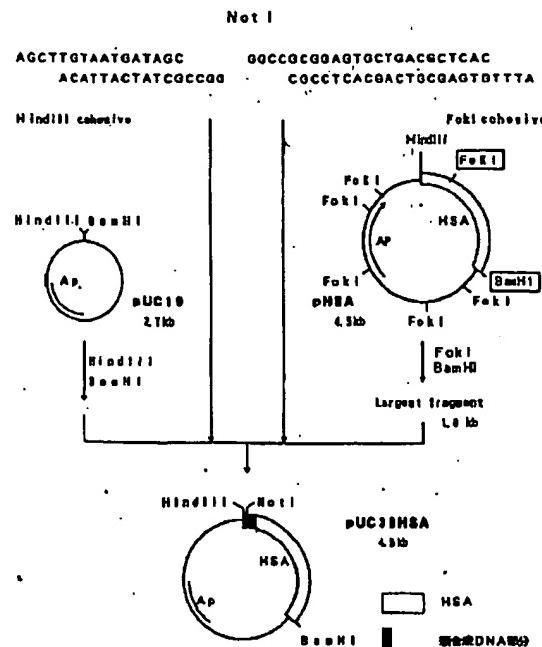
#### ・ 諸字母は書かねばならぬことをノ致難

【图12】

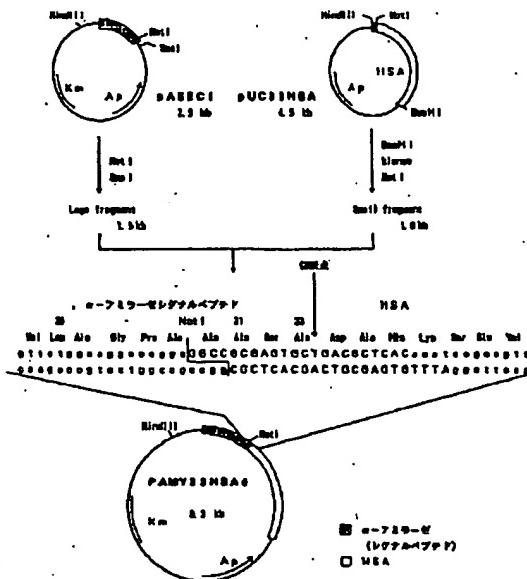
〔图9〕



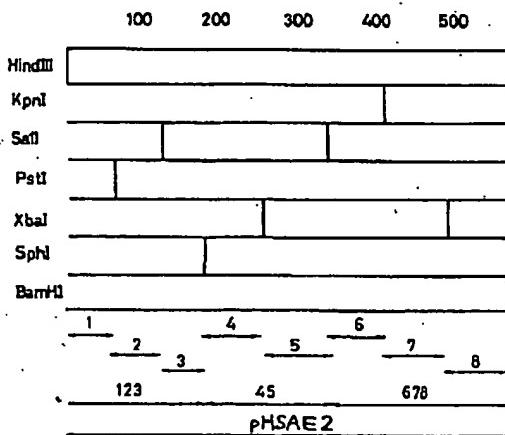
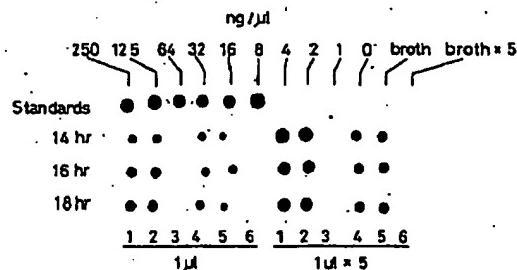
[図13]



[図14]



[図15]

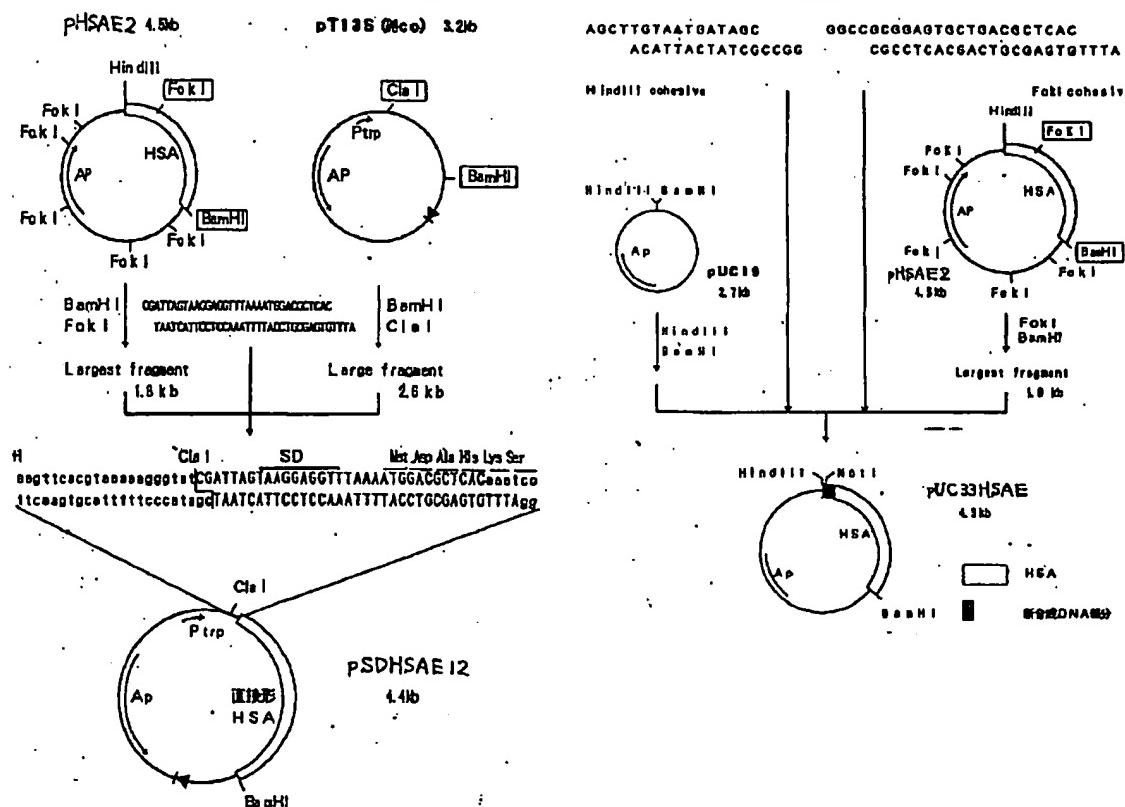


〔图16〕

S AACCTTGGGA TGGACGCCCA CAATCCGAA CTTGCCGACCC GTTTTAACAG CCGGGCTGAC  
 GAAAACCTTC AAGCCCCCTGT TTCTGATCCT' TTCCCTTCAGT 'ACCTTCAGCA GCTCCCTGTC  
 GAGGCCACAG TTAACTCTG AAACGAACTT ACCGAAATTCTG CTTAAACACTG CTGACTCTGAC  
 GAATCTCGAA AAAACTCGCA CAATCCCTG CACACCTCTG TCCGTTAACAA ACTGTCGACT  
 GTTCCGACCC TGGCCCAAAC TCAAGCTCAA ATGGCTGACT CTCGCCCCAA AGAGAACCG  
 CAACGAAACG AATGCTCTT CGACGACCAA GACGAAEACC CAAAGCTTCC ECGGCTGTT  
 CGTCCGAAAG TCGACCTTAAT GTGACGCCGA TTCCAGACAA AGCGAACAAAC CTTCGCTAA  
 AAATACCTGT CGGAACTTACGC AGCCGCTCAC CCCTACTTCTG AGCGACCGGA ACTGCTCTTC  
 TTCCCTAAAG CTTACAAAGG AGCTTCTAC GAATGCTTCC AGCGCCTGAA CAAAGCGGCA  
 TGCTCTGTGC CGAACATCGA CCAACTCTGCT GACGAGCTTA AGCGGCTTC TGCAAAACAG  
 CGTCTGAAAT GCGCTCTGCT CGAACATTC GCTGACCTG CTTCAACAGG TGCGGCAAGT  
 CGGGCCCTGT CGCAGCCCTT CGCGAAAGCA GAATTCGGAG AAGTGTCTAA ACTGCTTACT  
 GACCTTACCA AAGTTCACAC CGATGCTGC CACGGGGACG TTETAGATG TGCGAACAGC  
 CGTGGGCAAC TGGCGAAATA CATCTCCGAA AACAGGACACT CTCATCTTC HAAACTGAAA  
 GAAATCTGG AAAAACGGCT GCTCGAAAAA TCTCTACCTGCA TCCGAGAAGT AGAACACAGC  
 GAAATCCGG CGGATCTTCC GTCTCTGGCG TCTGACTCTG TGAAATCAAA AGACGCTGTC  
 AAAAACCTACG CAGAACCCAA AGACGATTC CTAGGATATOT TCTGTACGA ATACCTCTG  
 CGCACCCCGD ACTACTCTGT GGTTCTGCT CTCGCCCTGG CAAACACCTA CGAACACTAC  
 CTGAAAATCT CTGGCCGACG GGTGACCCA CACCAAGCTT ACACCAAAAGT TTGCGACGAA  
 TTCAACCCG TGTTGAGAGA AGCCGAGAAC CTGATCAAAC AGAACATCGCA ACTCTGCA  
 CAGCTGGTG AATACAAATT CGAACAGCTG CTGCTGTTCTG OCTACACCAA AAACCTACGG  
 CACCTCTCA CTCCGACCCG CGTCGAATCA TCCCTOATACC TGCTTAAGG TGCGCTAA  
 TGCTGAAAC ACGCGGAAAGC GAAACGTATG CCTCGCCCGG AGAACATCTG CTGCCGTTG  
 CTGAAACCGC TGTGCTCTC CGACAAATTA AGCCCGCTTT CTGACCTGTG AACTAAATCC  
 TOCACCGAACT ETCTGTTAA CGGGGGCTCC TGTCTCTCCG CTGAGAGGT TGCGAACAGC  
 TACGTACCA AAGATCTCA CGACGAAACG TTCTACTTCC AGCGGACAT CTGCCACCTG  
 TCCGAAACAA AGCGCCGAGT CAAACAAAGC AGCGCTCTG TGCAACTCTG AAAACACAA  
 CGGAAACAA CGAACAGACA ACTGAAACGG CTGATGGACG AGCTGCGACD TTCTGCTAGA  
 AAATCTCGCA AAGCTGACCA CAAAGRAACG TGCTGCTGAA AGAACGGTAA AAAACTCTGCA  
 GCTCCCTGTC AGGCTGACTG CGGGCTGTTA TGATAGGATC C '

〔図19〕

[図20]



[圖 18]

・プロダクト

```

Bind B
ACCTTCCGATGGCGCTCAAAATGCCAAGTTGGCGACCGCTTTAAAGACCTGGTCAGGA
          ACCTTACCTGGCGATGTTAGCTTACGGCGTGGCAGATTCTGGACCCATCTGGCTTTGAGT

ACCTTCAAGGCCTGCTTGTAGCTGGCTTGCGCTTCACTTCACTTCAGACTGCGCTTGGTGGCA
          TGGCGACCAAGAGCTGGAAAGGAGCTGGAACTTGGAACTCTCAAGGGCGATCTGGTGTCAAT

CCAGCTTAAAGCTGTTAAACCGAAAGTACCCGGTTTGGCTAAACCTTGGCTAGCTGGAAATCTGGCA
          TTGACCTTGGCTTCATGGCTTAAAGCTTGGTGGCTGGAACTCTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCA

```

7024

**Sp1E**  
 CCTCTGGGAAAGTCGGACCACTCGTGACCAAGCTTACCCGCTTCTCTGGAAAA  
 GTACGAGACGCCGTTCTGACTCTGTGACCCATGCTTCATTCGCCACAAAGCTTCTCTCCGAG  
  
 CACGGCTCTAAATGGCTTCTCTCAGAAGATTCTGGCTAACGGCTTCATTCAGC  
     ACTTTACGCCAAGAGCTTCTTAACCCATTCGCTCTAAGTTCGACCCCTC  
  
 GTCGGCACTTGTCCGCTGTCCAGCGCTTCCCGAAGCAGATTCOCAGAACT  
     AACGGCGGAAGGGTGCAGGCGCTTCTTCAGGCTTAAAGCATTTG  
  
 GCTAAACTGAACTGAACTGACCAAACTCACCCCCATGGCTTCTCTCCGACCTT  
     AECAAATGACTGCTGGTGTCAAGTGGCTTACGACGCCGCTTCTGGAAAGCTT

30-23

PstI  
 SAAGACTCCGACAAATCCCTGCACACCCCTTTGGTGCACAACTCTGCACGTTGGCACCCTGGC  
 ACCYCTTTCGCGCTTGGCGACCTGGTGGCAACGACCATTTTGCGACCGTGACACGCT  
  
 GAAACCTTACGGAAATGGTGACTCTGGCTGCTAAAGGGAAACCGGAACCGAACGAATGCTTCCT  
 GGAAACGGCTTTCGGACCACTTGGCTACCAACCCATTTCCTTGTCCCCCTTCCTTCCTT  
  
 TCAACCCAAAAGACCCACAACCCCGAATCTGGCGGCTTGGTCTGCCGGAA  
 ACCAGGAAAGCTGTTCTGCTGTTGGCTTGGACGGCGGCGEAGGAAAGLACGGCTTCAAGT Saitz

アロマ

**Ibel** [www.ibel.com](http://www.ibel.com) | 800-338-4353 | 201-666-1000 | 1-800-338-4353

CCTTCTTAACTGAGAATGCTGCCAAAACCGCTCTGCAGAAATCTCAGTCGATGCCAGAA  
 TTGACTTTCTTACGAGCTTGTGGCCACGCTTTTACAGTCACGTCACCTCTTCATCTT  
  
 CTGAGAAGACCCAAATGCCCGCCGATCTGCCCTCTGCCCTGCACTCTGTGATAAACAC  
 GCTGCCATTAGCCCCGGCTAGACGCCAAGACGCCCAACTGAACTTACTGTTCTGCCACGCTT  
  
 GTGTCGAAGAACTCTAGCAGAAGCAAAAGACGCTTATCTAGTAGTGTCCTGCTACGATACGCTG  
 -3812-  
 -3813-  
 -3814-  
 -3815-  
 -3816-  
 -3817-  
 -3818-  
 -3819-  
 -3820-

3823

```

818
TCCGACTTAATCTCCACCCCATTCGAAGAACAGGAAACCTTCTGTAAAATAAC
          GCTTACACCTGGCTAAGYGTCTTTCCTTTGGAAAGCTTCTTTATGACATGCT
CTCTACCGAATGCCAACGGCTCACCGTATCTTACGCACGGAACTGCTCTCTTGC-
          TTACCTCTGGCAGTGCGCATCAAGCTCGCTGGCTTGCACCAAGAAGCTTGTCC
CTAAACCTTACAAAGCACTTCTGATGCTTGTCTGGCTTGACAAAGCGGCACTE
          AGCTTCTGGCTTACCTGCTTACCTGCTTACCTGCTTACCTGCTTACCTGCTT

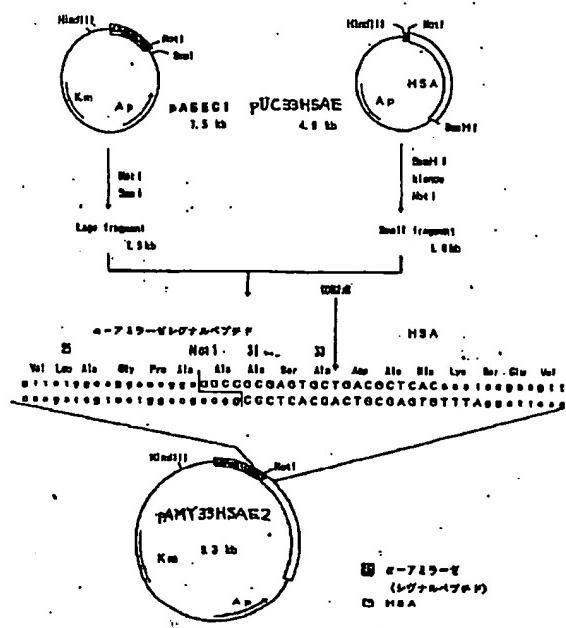
```

四

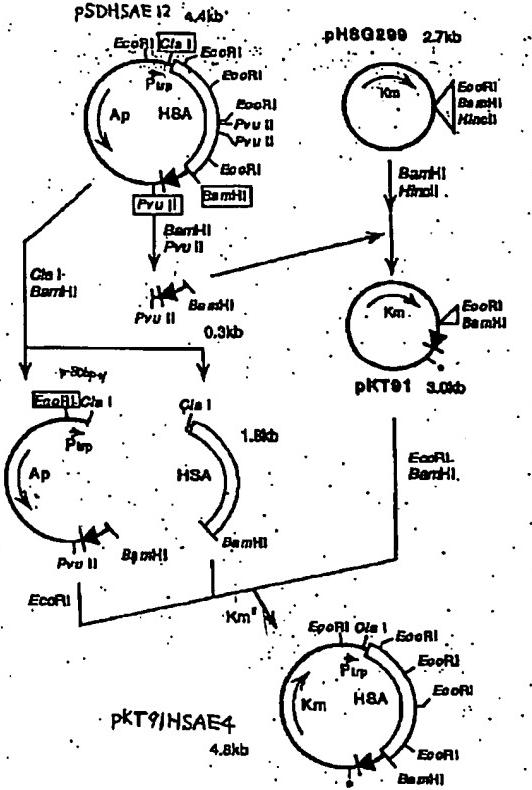
3180

圖 191

[图21]



[图22]



【手続補正書】

【提出日】平成3年8月22日

【手続補正1】

### 【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 図面の簡単な説明

### 【補正方法】変更

### 【補正内容】

## 【図面の簡単化】

### 【図1】本発明者ら

た、ヒト血清アルブミンをコードするDNA配列を示す図である。

[図2]ヒト血清アルブミンのN末端付近に単一の制限酵素切断部位を導入するために配置したFok I認識部位と切断部位を示す図である。

【図3】遺伝子中の制限酵素部位の配置を示す図である。なお、矢印はブロック1からブロック8各々の領域と、3つの中間的ブロックの領域、及びpHSAが保持する領域を示す。

【図4A】図4Aはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのプロット

ク1を示す図である。

【図4B】図4Bはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのプロック2を示す図である。

【図4C】図4Cはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのプロック3を示す図である。

【図4D】図4Dはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのプロック4を示す図である。

【図4E】図4Eはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのプロットである。

【図4F】図4Fはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのプロット

ク6を示す図である。  
【図4G】図4Gはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのプロック7を示す図である。

【図4H】図4Hはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのプロック8を示す図である。

【図5】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌の発現ベクターに接続するために作製した合成DNAを示す図である。なお、SDは、リボソーム結合部位を表す。

【図6】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌で発現するプラスミドpSDHSAE4の構築手順を示す図である。なお、プラスミドpT13S(Nco)は、大腸菌trpプロモーターを含む公知のプラスミドである。

【図7】ポリアクリルアミド電気泳動図及びウェスタンプロッティング図である。詳細に述べると(A)はSDSポリアクリルアミド電気泳動後、クーマシープルードタンパク質を染色した図である。また(B)は(A)の1/30量の蛋白を用いて同様の電気泳動後、ゲル内の蛋白をナイロンメンプランにエレクトロトランスファーし、抗ヒト血清アルブミン抗体を用いてウェスタンプロッティングした図である。図中の1, 2, 3, Mの略号は以下の通りである。1. HB101全菌体蛋白2. HB101/pSDHSAE12全菌体蛋白3. HB101/pSDHSAE12顆粒画分M. 分子量マーカー

【図8】精製顆粒蛋白のアミノ酸配列を示す図である。Observedは実際に観察された配列、Predictedは予定した配列を示す。

【図9】シャトルベクターpBU4371の構築を示す図である。

【図10】 $\alpha$ -アミラーゼの分泌に必須であり分泌時には切り離される、amyEのシグナルペプチドの切断点(A1a33)付近のアミノ酸配列及びDNA配列を示す図である。なお、矢印は、A1a33をコードする配列をGCTからGCCに置換することによってNotI部位が生ずること、及びシグナルペプチド切断点を表わす。

【図11】分泌ベクター構築のために作製した合成DNAを示す図である。

【図12】分泌ベクターPASEC1の構築図である。

【図13】pASEC1に接続するためのヒト血清アルブミン遺伝子の構築図である。

【図14】ヒト血清アルブミンを枯草菌で分泌するためのプラスミドpAMY33HSA4の構築図である。

【図15】1A510/pAMY33HSA4または1A510/pAMY33HSAE2及び1A510/pBU4371の培養14, 16, 18時間目の培養上清1μlを1回及び5回ナイロンメンプランにスポットし抗ヒト血清アルブミン抗体でプロッティングした図である。Standardsは、SIGMAのEssential globulin free HUMAN Albuminを用いた。Brothの位置には、培地をスポットした。図中の1, 2, 4, 5の位置には1A510/pAMY3または1A510/pAMY33HSA4

HSAE2を、3, 6の位置には1A510/pBU4371をそれぞれスポットした。

【図16】本発明者らが設計し、実際に全合成して構築した、ヒト血清アルブミンをコードするDNA配列を示す図である。

【図17】遺伝子中の制限酵素部位の配置を示す図である。なお、矢印はプロック1からプロック8各々の領域と、3つの中間的プロックの領域、及びpHSAE2が保持する領域を示す。

【図18A】図18Aはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのプロック1を示す図である。

【図18B】図18Bはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのプロック2を示す図である。

【図18C】図18Cはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのプロック3を示す図である。

【図18D】図18Dはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのプロック4を示す図である。

【図18E】図18Eはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのプロック5を示す図である。

【図18F】図18Fはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのプロック6を示す図である。

【図18G】図18Gはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのプロック7を示す図である。

【図18H】図18Hはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのプロック8を示す図である。

【図19】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌で発現するプラスミドpSDHSAE12の構築手順を示す図である。なお、プラスミドpT13S(Nco)は、大腸菌trpプロモーターを含む公知のプラスミドである。

【図20】pASEC1に接続するためのヒト血清アルブミン遺伝子の構築図である。

【図21】ヒト血清アルブミンを枯草菌で分泌するためのプラスミドpAMY33HSAE2の構築図である。

【図22】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌で発現するプラスミドpKT91HSAE4の構築手順を示す図である。

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

【補正内容】

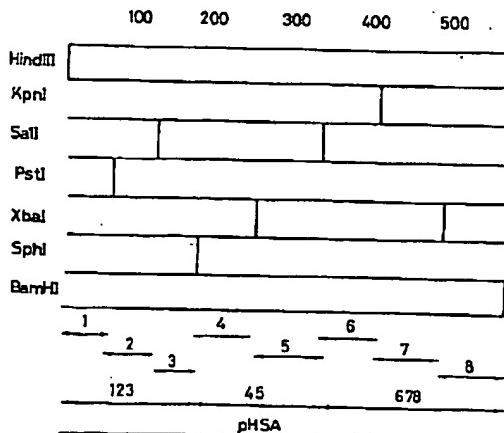
[圖 1 ]

8' AAGCTTGGGA TGGACGCTCA CAAATCGGAA GTTGCGCACCC GTTTTAAAGA CCTGGGGTAG  
 GAAATCTCA AAGGGCTGT TCTGATCCTG TTTCGCTCACT AGCTTCACCA CGTCGGGCTTC  
 CAGCCACCCG TAAATCTGGT AACAAAGGATA ACCCAAATTGC CTAAACCTCG CGTACTCG  
 GAAATCTCGA AAAATCGGA CAAATCCCTG CACACCCCTG TCCCGTGACAA ACTGTCAC  
 CTTGGCGACC TGGCGGAAC ACCTGGTAA ACCTGGTAC' GCTGGCGCTAA ACAGGGACCC  
 GAACCCAAAG AATGCTCTCCTG CAGCACCAA GAGCGAACCC GAAACCTCGG CCGGGCTCTG  
 CGTGGCGGAAC TGGCGCTTAAT GTGCGACCCG TTCCACCGACA AGCGGAAGAAC CTTCCTGAA  
 AAATACCTGT AGGAAATCGG ACGGCTCTGC CGCTACTCTT ACCTGGTCTG AGCTGTTG  
 TTCCGTAACAG GTTACGAAAGC AGCTTCTCATG GATGTTGCGT AGCGGACGGTAA CAAAGGGCA  
 TGCCCTGCTCG CAAAGACTGG CAAGAATCTG CAGGACGAGT ACCTGGCTTC TCACAAACAC  
 CGTCCTAAATG GCGCTTCTCTG CAGAACATTC GTGGAACGTO CATTCAAAGGAG GTGGGGAGGT  
 GGGGGCTCTG CCGAACGGCTT CCGGAAATGCA GAATTCGCCAG AACTGCTCTAA ACTGCTTAACT  
 GACCTGACCA AAGTTCACCG CGAATGCTGG CGACGGGGCTG TTCTAGACTG CGGAGACGAC  
 CGTGGGACCC TGGCGAAATAA CATCTCGGAA AACCGGACACT CCATCTCTC AGTAACTGAA  
 GAATGCTCGG AAAAACGCCGCT CGTGGAAAAA TCTCACTGCA TCCCGAGAACT AGAACACGAC  
 GAATGCTCGG CGGATCTGGC TCTCTGCG GCTGACTCTG TTCAATCAAA AGACGCTG  
 AAAAACCTACG CAGAACCAA ACAGCTGATTC GAGCTGATG TTCTGTAGCA ATACACCTGG  
 CGACACCCGG ACTAATCTGT CGTCCTGCTG CTGGCGCTGG CAAACAACTA CGAACATCAG  
 ETGGAAAAATG CGTCGGCAGG CGCTTACCCA CAGGAATCTG ACACAAAGATG GTTGGGACCA  
 TTCAACCGC TGTTGAAGA ACCGGACACG CTGCAATGAAAC GAAACTGGCA ACTGTTTAA  
 CAGCTGGGGT AATACAAATG CGAACAGCTG CTGCTGGTTC CGTACACCAA AAAGCTTACCG  
 CAGCTGCTCA CTCCCGACCTG CGTCGAAGT TCCCGTAACCG CGCTTAAGGT TGCTCTAA  
 TGCTCGAACAG ACCCGCGAACG GAAACCTATG CGTGGGGCCC-AAGACTACCT GTTGGGCTG  
 CTGAAACCGC TGCTGGTGTG CGCAGGAAA ACGGGCGTTG CTGAGCTGTG AACTAAATG  
 TGCAACCGAT CTGCTGGTTA CGGGCGCTGG TCCCTTCTCC CGTACAGGDT TGACGAAAC  
 TAATCTACCGA AAGAATCTCA CGCAGAAATG TTCACTTTCG ACCTGGGACAT CTGACCCCTG  
 TCGGAAAGAA AGACCCGAGAT CAAAGAACAGC ACGGCTCTGG CTAACTGGTAA CAAACACAA  
 CGGAAACCAA CAAAGAACACG ACTGAAAGGG BTGATGCGAGG ACTCTGGCAGC TTTCTGAGAA  
 AAATGCTCGA AAGCTGGAGA CAAAGAACAACT CGCTTGGCTGG AAGAAGGTTA AAAACTGCTA  
 OCTGCTCTG AGGGCTCACT GCGGGCTGAA TGAGGATCAGT C 3'

〔圖2〕

ヒト血清アルブミンのN末端  
 AspAlaHisLysSerGluValAlaHisArgPheLysAspLeuCysGlu  
 AAAGCTTGGGATGGACGCTCACAAATCCGAAGTTCCGCACCGCTTTAAAGACTGGGTGAG  
 TTCCGAAACCTAACCTCCGAGTGTAAAGCTCAACGCCGTGGCAAATTTCTGGACCCACTC  
 FokI 切断部位

[图3]



```

プロタク1

Bind III
ACCTTGCCATGCCGCTCAAAATCCGAAGTTGGCAGCTTAAAGACCTGGGTGAGGAA
ACCCCTACCTGGAGGTGGTAGGCTTCAGCGCTGGAAATTCTGGACCCACTTTTGAGTT

AATCTTAAACCCGGTCTGATCTGGCTTAACCTTACGCTAACCTGGGCTTGAGGA
TCCCCGCCAACATCGCCAAAGGCTCATGGAGCTCATCGGGCACCTGGGTGCGTCAAT

CCACCTTAACTGTTAACCGAAGTAAACCGAAATTCCGCTAGCTGGAGATCTGCA
TTGACCATTTGCTCATGGCTTAAACGATTTGGACCATGCACTGGCTTACG PatE

```

[图 4 B]

```

 $\text{P}_{\text{SII}}$  GAAACTCCGACAAATCCCTGCACACCCCTGTCACAAACTTGCACTTGGCACCCCTGGC .  

ACCTTTTACGCCCTGTTGGGACCTGGGACAGCCACTGTTGACACGTGACACCT  

 $\text{GAAACTACCGTGAATGGCTGAGTCGTCGCCGTAAGCAGGAAACGGAAACGCAACGAAATGCTTCTT$   

GGGACGCCCTTGGTGGCAGCTTACGGACTGGAGCCGGGATTTGCTTGGCTTGGGTGCTT  

 $\text{TCAGCAAGAACACACCCACCTGGCGGCCGGCTGGTGGCTGGAGAC}$   $\text{S}_{\text{SII}}$   

ACGAAGGAGCTGCTTCTTGGCTTGGAGGCCGGGGACAAAGCCGGCTTGGTGGCTT

```

[图4C]

ブロック 3  
 \$LLI  
 TCCACGTAATCTCACCGCCATTCCACGCCAACGAAAGAACCTCTGAAAAATAAC  
 GCTTACACGGCGGTAAAGTCCTGTCTCTCTGGAGGACTTTTATGGACATCT  
 CTGTCACCAAGCTACGCCCCCTAACCGCTTCTCTTACCGCCACCGGAAGTCTGTTTCTG  
 TTACGCTGGCGCACTGGCGATGAGAATGCGTGTCTTGACGACAGAAGCCTTCCG  
 CTAAACGTTACAAAGCACTTCTGATGCTGGCAAGCCGCTGCAAAAGGCTTAC  
 ATGTTCTGCAAGTGACTTACGAGGCTGGCGGACTCTTCTG 3pB1

[図4D]

ブロッカ4  
 SphI  
 CCTCTGCGGAAACTGGGAGCTGGTGGCGGAGGTAAAGGCTTCTTCGAAAA  
 GTACGAGGAGGCGCTTGTGACCTGTTGACCACTGCTTCATCCTCCGAGAAGCTTGTCCAG  
 CAGGCTCTGAAATGCCCTTCTCTCAGAAAATTGGTGGACCTGCTTCAAGC  
 ACTTTACCGGAAGAGCTTAAAGCCACTTGGACTTAAGTTTCCACCGCTC  
 GTGGGGAGTGGCGGCTGTCGACCGCTTCCCCAAAGAGATAAATCCAGACT  
 AACCGAGGACAAAGGTTGGCGGCGGCGGCTGCTTAAGGCTTCTTCAGATTTG  
 GCTTAAGCTGGTGTGACTGCTTCAAGAAAATGCTTGGCGGCGGCGGACCTT XbaI  
 ACCAAATGCTGGACTGCTTCAAGCTTGGCTTGGACTGAGCTGGCGGCGGAGATC

[図4E]

プロテク5  
 IbaI  
 CTAGACTGCCGAGCCACCTGCGACCTGCCAAATACATCTGCCAAACCCAGACTCCAT  
 TCCCCCTCTCTGGCACCGCTTGTGACCTTTGGTCTGAGCTTACAGAAGAT  
 CTCTTCTAAACTGAAAGAATGCTGCCAAAACCGCTGCTGGAAAATCTACTGCATGCCAGA  
 TTGACTCTTCTACACGGCTTTGGGCGACCTTTAGACTGACTGAGCTTACGGCTTCTCACTT  
 CTGAGAAAACGAGAAATGCCGGGGGATCTCCCGTCTGGGGGTGACTCTGGTGTGATCMAAGAC  
 GCTGCTTCTGGGGGGCTACAGCGAAGACCCGAATCTTCTGAGCTTACGGCTTCTCACTT  
 GTGTCGCAAAAACCTGCCAGAGCAAAAGACCTATCTCTAGGTATGTTCTCTGAGCTAATGGCTCG  
 TTGATCCTCTCTGCTTCTGATAGGACCTACAGAACGACATGCTTACGGCTTCTCACTT

[EX 4 F]

[图 4 G]

[图4H]

[图 5]

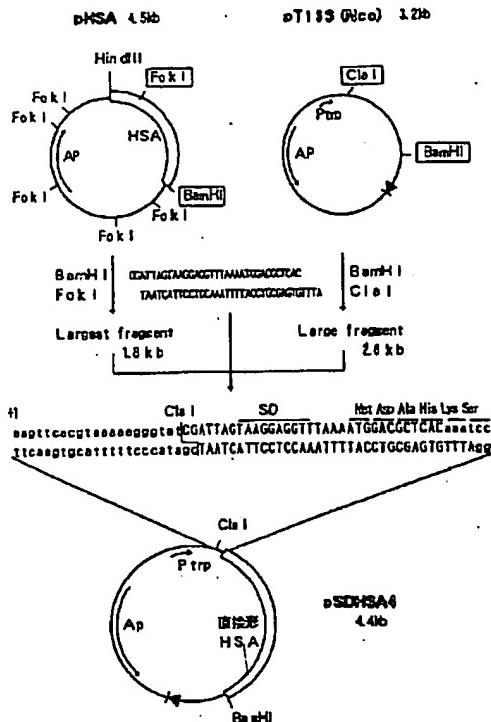
【图7】

[図8]

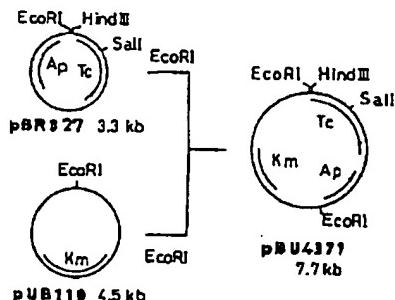
Observed : Met-Asp-Ala-His-Lys-Ser-Glu-Val-  
 Predicted : Met-Asp-Ala-His-Lys-Ser-Glu-Val-

Ala-His-Arg-Phe-Lys-Asp-Leu-Gly

[図.6]



[図9]

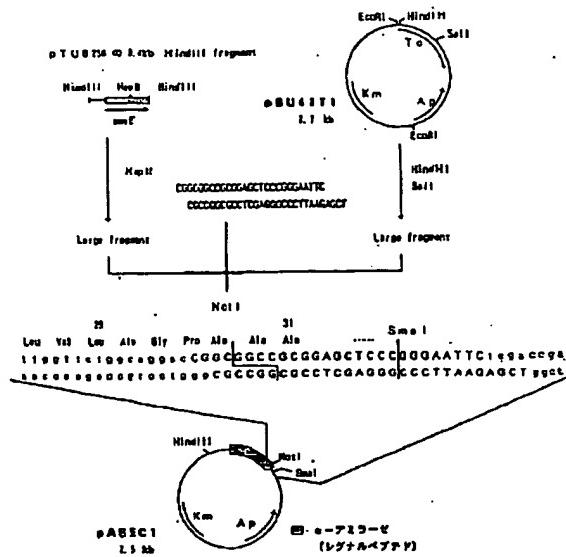


(E 10)

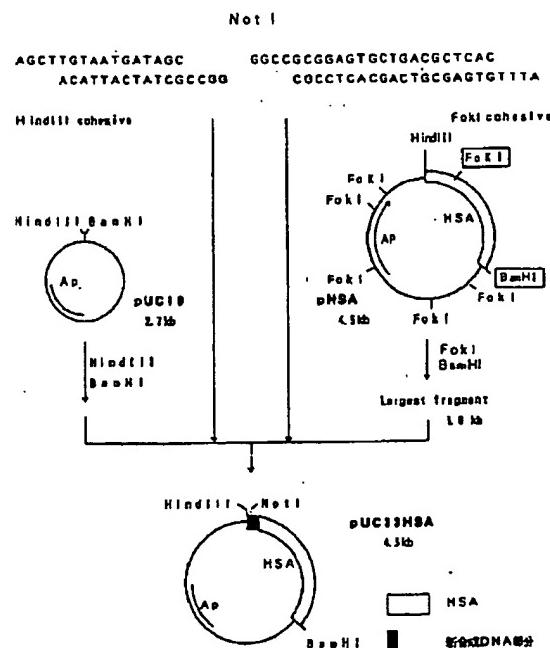
【図11】

5' Not I Sac I Sma I Eco RI  
 CGGGCGGCCGGAGCTCCCGGAAATTC  
 CGGGCGGCCCTCGAGGGCCCTTAAGAGCT  
 Kpn II cohesive Sall cohesive

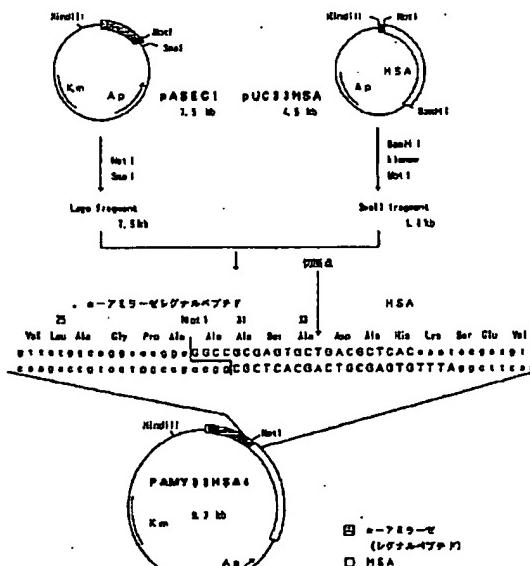
【図12】



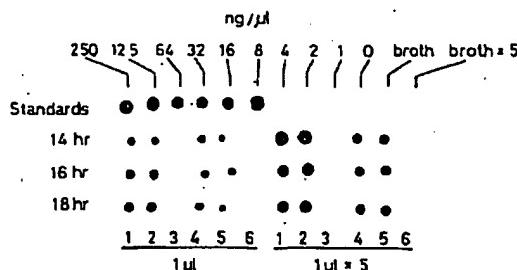
【図13】



【図14】



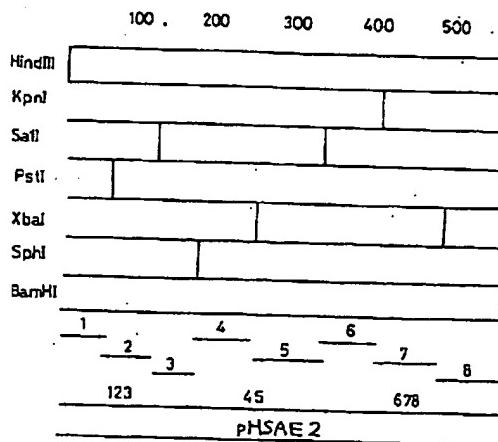
【図15】



【図16】

3' AAGCTTGGGA TCGACCCCTCA CAAATCGCAA GTCGGGACCC GTTTAAAGA CCTGGGTGAC  
AAAAACTTCA AACCCCTGCT TCTGATCCTT TTCCCCCTCACT ACCTTCACCA GTCCCCCTTC  
GAGGACCAACG TTAAACTGGT AAAACGAAGT ACCGAATTGG CTAAACACCTG CCTAGCTGAC  
GAATCTGGCA CAAACTCCCTG CACACCCCTG TCGGTGACAA ACTGGTGCAC  
GTTGGGACCC TCGGGGAACG CTACGGTGAA ATGGCTGACT CCTGGGCTAA ACAGGAACCC  
GAACCCAAACG AAATGGCTCC TCAAGCACAA GAGGACACCC CGAACCTGGG CGGGCTGTT  
CTGCCCCGAAG TCGACCTTAAT GTGCAACCCAA TTCCACGGACA AGGAACAAAGG TTCCCCTGAAA  
AAATACTCTG ACCAAATGCG ACCGGCTGAC CGCTACTTGT ACGGCACGGGA ACTGGCTTTC  
TTCCCTAAACG GTTACAAAGG AGCTTTCAT GAATGCTGEE AGGCGGCTCA CAAGGGCCCA  
TGGCTCTCC CGAAACTGCA CGAACCTGCT GACCAAGGTA AGGEGCTTTC TGAAAACAC  
GGTCTGAAAT GGCGCTTGTCT CGAGAAATTCG OGTGAACCTG CATTCAAAGG GTGGGAGTT  
GGGGCCCTGT CCCAGCGCTT CGGGAAAGCA AAATTCGGAG AAGTGTCTAA ACTGGTACT  
GACCTGACCA AAGTTCACAC CGAATGGTGC CAGGGCGACC TTCTAGACTG CGGAGACCC  
CGTCCCCGACG TCGGGAAATA CACTTGGCAA ACCAGGAGT CGATCTTTC TAAGCTGAAA  
GAATGCGCG CGCATCTGCC GTCTCTGGGG GCTDACTTTCG TTGAATCAA AGAEGGTGTC  
AAAAACTCTAG CAGAACCAAAG AGACGTATTC CTAGGTATGT TCGTGTACCA ATACCCCTGT  
CCACACCCCG ACTACTCTGT GGTCTCTCC CTGGCCCTGG CAAAAACTCA CGAAACTTAC  
CTGGAAAAAT GTGCGCCAGG CGCTTGACCA CACGAATTCG AGGCAAAAGT CTTCGACGGAA  
TTCAAAACCC CGTGTGAAAG ACCCCACAAAC CTGATCAAAC AGAAACTGGCA ACTGGTCCAA  
CAGCTGGGTG AAATAACATT CCAGAACGGT CTGCTGGTTC GCTACACCAA AAAGGTACCG  
CAGGTGCTA CTGGCCACCG GCTGGAAGTA TCCCGTAAACG TGGGTAACG TGCGCTTAA  
TGCTCCAAAC ACCGGGAAGG GAAACGTATG CGGTGCGCG AGACATACCG CTGGCTGCG  
CTGAACCGACG TGCTGGTTCT CGACGAAAGA ACCCGGGTTT CTGACCGCTGT AACTAAATGC  
TGCGACCGACG TGCTGGCTCC CGTGTGACCG CTCTAGAGGT TCACGAAACG  
TACGTTACCGA AAGAATTCCG CGCAGAACCC TTCACTTTCC AGGGCGACAT CTGGCACCTG  
TCCGAAAAAG AACGGGAGAT CAAAAACACG ACCCGCTCG TGGAACCTGGT AAAACACAA  
CCGAAAGCAA CAAAGAACCA ACTGAAAGCG GTGATGGACG ACTTCGGCAGC TTTCGTAAGA  
AAATGCTGCA AAGTTCACCA CAAAGAACCC TGCTTGGCTG AAGAAGGTTAA AAAACTGGTA  
CTGCCCCCTGCTC AGGCTGCACT CGGGCTGTAA TGATAGGATC C'

【図17】



【図18 A】

プロット I  
HindIII  
ACGTTGGGATGGACGGCTCACAAATCCGAAGTTCGGACCCGTTAAAGACCTGGTCACCA  
ACCTACTGCGAGTCGTTAGCTTCACGGCTGGCAAATTTCCTGGACCCACTCTTTTGAACTT  
AACTTCAAGGCTGTTCTGATGCTGGCTTGGCTAGTACCTTCACGCTGGCCGTTGGCTGGCA  
TCCGGACCAAGACTAGCGAAAGGGAGTCATGGAGCTCTCAAGGGCAACCTCTGGCTGGCAAT  
CCACCTTAAACTGTTAAACCAAGTAAACCAAATTCGTTAAACAACTGGGCTGCTGGCTGGCA  
TTGACCEATTGTTCTGCTTAAACCGATTTTGACCCATCGACTCTTAG PstI

【図18 B】

プロット II  
PstI  
GAAACTGGCAAAATTCCTGCAACCGCTTCTGGTCAAAACTGTGCACTTTCGACCCCTGGC  
ACGCTTTTGACCTCTTTACCGACGCTGTGGGACAGGCACTTGTGACACCTGACAAAGCT  
GAAACTACCGCTGAAATGGCTGACTCTGGCTAAACAGGACCCACCCACGGAAATGGCTTCT  
GGGACCCGCTTTCGATGCGACTTACCGACGCTGACCGCGCAATTGCTTGTGCTTGTGCTT  
TCAGCACACAGGACAAACCCGACCTGGCCGCGCTGGTCTGGGAGC  
ACGAGGAAAGCTGTTCTGCTGTTGGCTTGGACGGGGGGACCAAGCAGGCGCTTCACT

[図 18C]

ブロック 3  
 5'端  
 TCCACGCTAATGTGCCACCGCATTCACGACAACGGAAACCTTCTGAAAAATAAC  
 CCATTACACGTTGGCTTAAGCTCTGTTGCTCTTGTGAGGACTTTTATGGACATGCT  
 CTGTACCAAAATGCCADGCCCTAACCGCTTACGCCACGGAACTGTGTTCTGC  
 TTACGCTTUCGGCAGTGGGCATGAGCTCCTGGCTTACGCCAGAAGCCGATTGCA  
 CTAAACGTTACACAGGATCTGATGATGCTGCCACGGGCTTGACAAACGGGATC  
 ATGTTCTTCTGAGTCACTTACGCCGCTTACGCCGATCTTGGC Sobi

[图 18D]

ブロッカ  
 SphI  
 CCTGCTGCCAAAATCGCCGAACTGGCTTCAACAGGTAGGCTTCTTCGAAAG  
 GTACGAGCAGCCGTTTGACCTGCTTGTGACCTGCTTCATTCGAGAGCTTTGTCGAG  
 CAGCTCTGAAATGGCTTCTCTCTGAAATTCTGGTAAGCTCATTCAGG  
 ACTTTACCGGAAGAGGTTTAACTGGACTGGAGTAAAGTTGGCACCCGC  
 CTGGGAGCTTGGCGGCTTGTGCCAGCGCTTCCGAAGCAGAATTCGGACAGT  
 AAACGGGCAADGGTGGCCGGGGCTTCTTCAGGCTTCTTCAGGATTTG  
 GCTGAAACTGGCTTGTGACCTGAAAGTCAACGGAACTGGCCGAGCTT XbaI  
 ACCAAATGGCTTGTGACCTGAAAGTCAACGGAACTGGCCGAGCTT  
 GCTGAAACTGGCTTGTGACCTGAAAGTCAACGGAACTGGCCGAGCTT

[図18E]

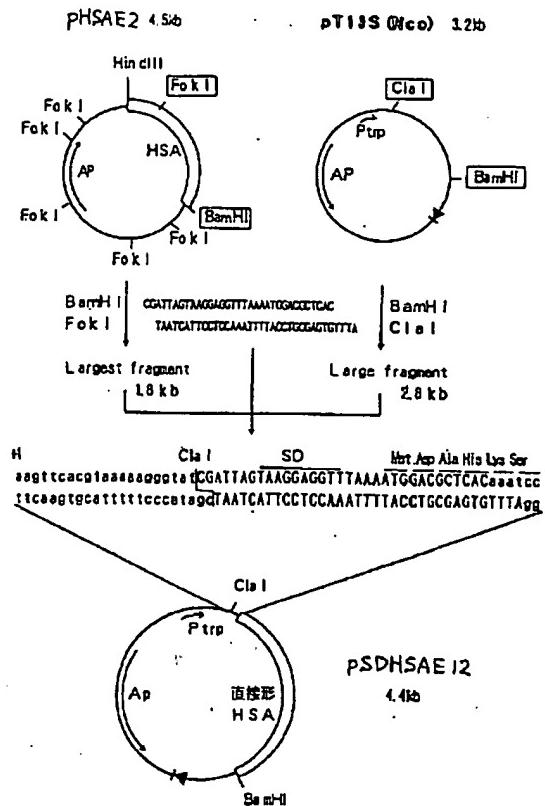
プロトクル  
 IbaI  
 CTAGACTGGCCAGACGCAACCTGGGACCTTGGCAAATACATCTGCCAAACCCAGGACTCCAT  
 TCACGCCCTCTGTGCGCACCCCTGGACCCCTTATGAGCCCTTGGCTCTGACCTAGAGAAGAT  
  
 CTCTTCTAACTGAAAGAATGCTCCGAAAACCGCTGTGGAAAATCTACTGCATGCCAGAA  
 TTGACTTTCTTACGACCCCTTTTGGCGACGACCTTTTACAGTGACTGAGCTGGCTTCATCTTIT  
  
 GTAGAGAAAACGACCAAACTGGCGGATCTECCCTCTTGTGGCGGTGACTCTGGTAATCAAAGAC  
 CCTGCTTACGGCCGCTAGAGCGGAAGACCCGGGACTGAGAACACTTCTTGGCTACACGGT  
  
 GTCCTGAAACCGACGACGACAAAGACCTTCTAGGTCTTACGGAATCTGGCT  
 TTGATGCTTCTCTGCTCATAGGAATCTATCACGGCACATCTTATGCGACGACCT 341

[図18F]

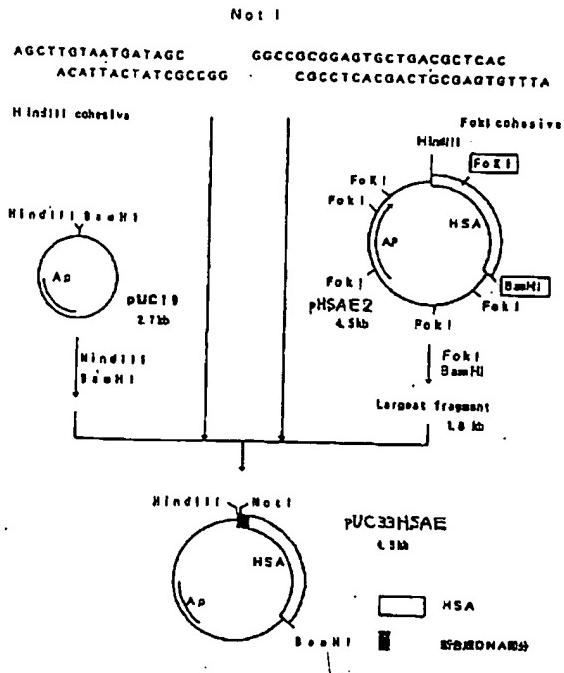
[图 18G]

[図18H]

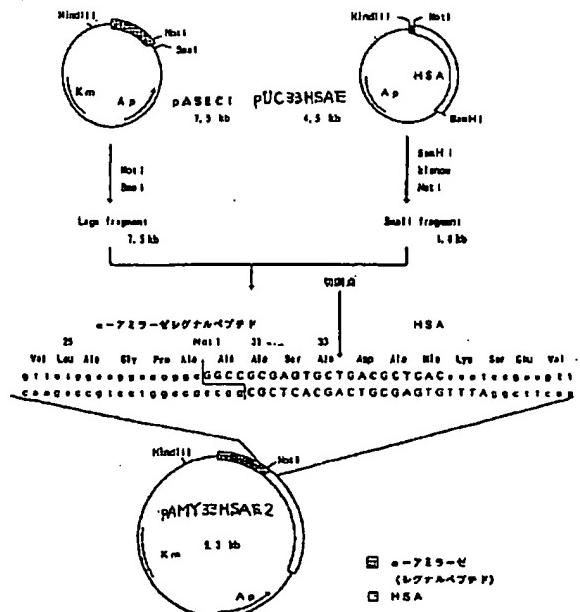
[図19]



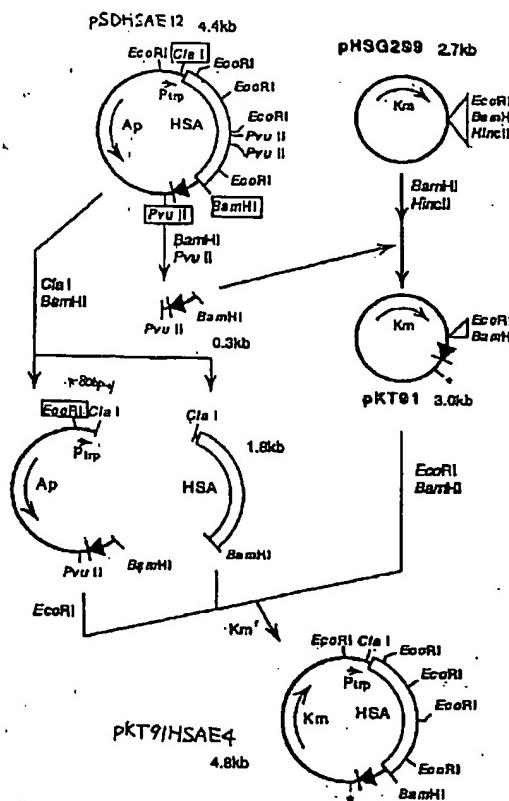
[图20]



〔図21〕



【図22】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:125)				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:125)				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:08)				